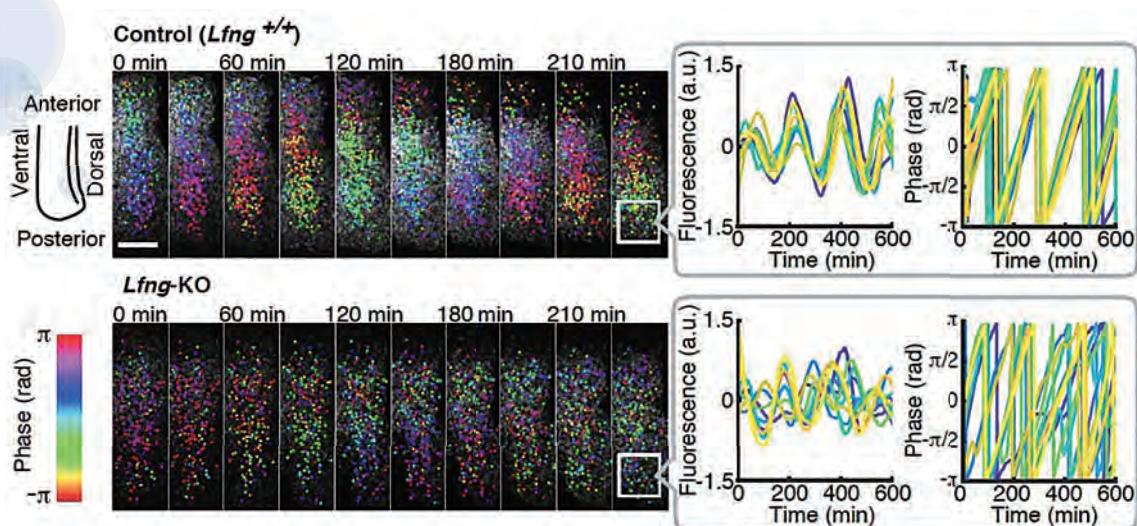
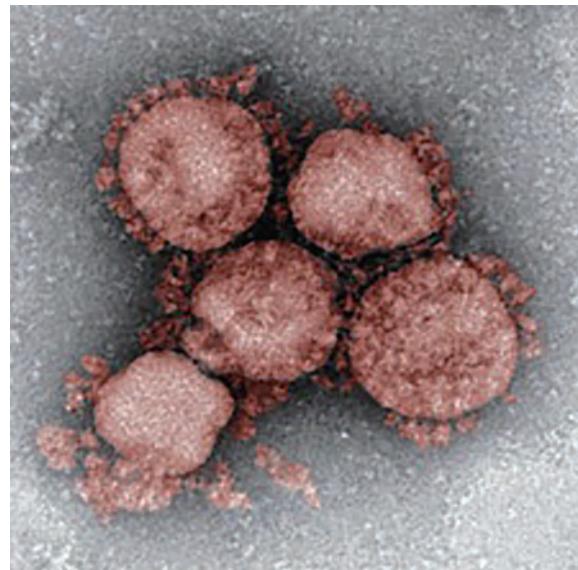


Annual Report

of the Institute for
Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University Vol. 5 2020



京都大学ウイルス・再生医科学研究所年報

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

Vol.5 2020

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

表紙：

新型コロナウイルスのネガティブ染色像。ウイルス粒子はスパイクタンパク質に覆われ、王冠のような形態を示す。

未分節中胚葉における Hes7 のライブ・イメージング。Hes7 は、野生型（上側）では同期振動するが、*/Lfng/* を欠損すると振動は減弱して細胞間で脱同期する（下側）。

Cover:

Negative staining electron microscopy of SARS-CoV-2 particles. The spike proteins decorate the virion surface, showing the appearance of a crown.

Live-imaging of Hes7 expression in the presomitic mesoderm. Hes7 expression oscillates in phase in the wild type (upper) but becomes dampened and out of synchrony in the absence of */Lfng/* (lower) .

CONTENTS

Research Activities

ウイルス感染研究部門 Department of Virus Research	
ウイルス制御分野 Laboratory of Medical Virology	1
RNA ウィルス分野 Laboratory of RNA Viruses	4
微細構造ウイルス学分野 Laboratory of Ultrastructural Virology	10
がんウイルス分野 Laboratory of Tumor Viruses	15
細胞制御分野 Laboratory of Cell Regulation	19
免疫制御分野 Laboratory of Immune Regulation	23
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	28
生体材料学分野 Laboratory of Biomaterials	34
再生免疫学分野 Laboratory of Immunology	45
再生免疫学分野（瀬原） Laboratory of Immunology	51
臓器連関研究チーム Inter-Organ Communication Research Team	54
組織再生応用分野 Laboratory of Tissue Regeneration	57
臓器・器官形成応用分野 Laboratory of Organ and Tissue Reconstruction	64
発生エピゲノム分野 Laboratory of Developmental Epigenome	67
統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science	71
生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology	75
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	80
バイオメカニクス分野 Laboratory of Biomechanics	85
発生システム制御分野 Laboratory of Developmental Systems	94
システムウイルス学分野 Laboratory of Systems Virology	98
増殖制御システム分野 Laboratory of Growth Regulation System	106
RNA システム分野 Laboratory of RNA System	113
生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System	117
組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis	122
数理生物学分野 Laboratory of Mathematical Biology	126
幹細胞遺伝学分野 Laboratory of Stem Cell Genetics	130
がん・幹細胞シグナル分野 Laboratory of Cell Fate Dynamics and Therapeutics	135
幹細胞デコンストラクション分野 Laboratory of Deconstruction of Stem Cells	140
情報制御分野 Laboratory of Regulatory Information	143
附属感染症モデル研究センター Research Center for Infectious Diseases	
霊長類モデル分野 Laboratory of Primate Model	145
ウイルス感染症モデル分野 Laboratory of Infectious Disease Model	148
ウイルス共進化分野 Laboratory of Virus-Host Coevolution	153
マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team	158
附属再生実験動物施設 Center for Animal Experiments	160
附属ヒト ES 細胞研究センター Center for Human ES Cell Research	
臨床基盤分野 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research	162
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	166
共同研究	168
構成員名簿	196

Research Activities

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

ウイルス制御分野
Laboratory of Medical Virology

教 授 橋口 隆生 Prof. Takao Hashiguchi

感染症は今なお世界中の子どもたちの脅威となっている。この問題を解決するため、本分野では、小児関連のウイルス感染症の研究を行っている。特に、ウイルスの細胞侵入機構および化合物・ペプチド・糖鎖・抗体による侵入阻害機構の解明に注力し、ウイルス学的手法と構造生物学的手法を組み合わせたアプローチで研究を進めている。主要研究項目としては、ウイルスの病原性の解明とウイルス疾患に対する予防・治療法開発の2つが大きな柱となっている。2020年9月に本研究所に着任し、パラミクソウイルスとコロナウイルスについて研究を開始した。

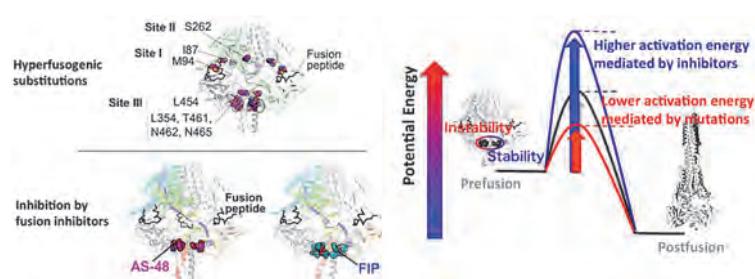
1) パラミクソウイルス中枢神経感染の分子機構解明と創薬研究

現在、世界的に流行が拡大中の麻疹（はしか）の原因である麻疹ウイルス（MeV）及び本邦で年間数十万人から百万人を超える感染者が推計される流行性耳下腺炎（おたふくかぜ）の原因であるムンプスウイルス（MuV）は、共にパラミクソウイルス科に属し、中枢神経系感染を起こすことがある。MeVは低頻度ながら極めて予後不良の亜急性硬化性全脳炎（SSPE）や麻疹封入体脳炎を引き起こし、MuVは神経指向性が強く、髄膜炎やムンプス脳炎・難聴といった重篤な合併症を引き起こす。現在、両感染症には特異的治療薬は存在せず、対処療法しかない。

こうした中枢神経系感染・発症機構の大部分は未解明であるが、我々の研究チームは、ウイルス学・情報科学・実験動物学・小児神経科学の共同研究体制を構築し、健常児およびSSPE患児由来iPS細胞を用いた脳オルガノイドの構築、パラミクソウイルス神経感染に必要な宿主因子の解析、ウイルス側・宿主側の神経感染責任因子の構造解析、構造情報を活用した阻害剤設計と合成、感染阻害効果検証等を行い、多分野融合による多階層の研究推進で、パラミクソウイルス中枢神経感染の詳細な分子機構解明と治療法創出を目的として研究を行った。

MeV膜融合（F）蛋白質への網羅的変異導入実験により、F蛋白質構造上の特定の位置に変異が導入され膜融合能が亢進することで神経感染を起こす変異ウイルスが生じることを確認した（Fig. 1）。

また構造情報を活用して、in vitroで効果の高い感染阻害分子をデザインすることにも成功した。感染・発症後にはワクチンでは治療効果はないため、本研究による神経感染機構解明と創薬は国民の健康向上に貢献し、今後



出現する可能性がある類縁ウイルスによる未来のアウトブレイク対策にもつながる。

2) 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に対する創薬研究

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のウイルス表面にある Spike（S）蛋白質は、ウイルスと受容体 ACE2 の結合を担っており、宿主域および細胞・組織指向性の決定という点で極めて重要な役割を果たす。同時に、この S 蛋白質は我々ヒトの獲得免疫系が SARS-CoV-2 を認識して、液性および細胞性免疫応答を起こす際に極めて重要な役割を果たす分子でもある。特に抗体が S 蛋白質のどこを認識して中和能を発揮するかということは、ワクチン開発や抗体医薬等の予防・治療法開発に重要な情報となる。そこで、我々はこの S 蛋白質が構造を保った状態で大量に発現・精製できる系を構築した。また実験によって望んだ標識が出来る S 蛋白質も作製し、ワクチン開発や治療薬開発、免疫解析に活用できる提供体制を構築した。

Infectious diseases still have been a fatal threat to children, worldwide. To solve the problem, we have been studying on pediatric virology. In particular, we focus on the mechanisms of viral entry into cells and the inhibition of entry by compounds, peptides, glycans, and antibodies, using a combination of virological and structural biological approaches. Our major goals are the elucidation of viral pathogenesis and the development of preventive and therapeutic methods for viral diseases. Our laboratory was newly joined in this institute in September 2020, and started to research on paramyxoviruses and coronaviruses.

1) Study of molecular mechanisms of paramyxovirus infections in the central nervous system

Measles virus (MeV) and mumps virus (MuV), members of the family *Paramyxoviridae*, are important human pathogens causing respiratory and neural infections. Globally, MeV has been causing outbreaks recently and over 200,000 deaths were reported in 2019. MeV usually causes acute measles, but in rare instances induces fatal and intractable neurological diseases such as subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). MuV causes epidemic parotitis, meningitis, encephalitis and deafness. Large outbreak of mumps occurs once every four to five years, and over a million individuals are estimated to be infected every year in Japan. Currently no licensed therapeutic agents are available for both viruses.

Although the mechanisms underlying MeV and MuV infections in the central nervous system (CNS) remain largely unknown, our group previously 1) revealed that hyperfusogenic MeVs can spread in human neurons and in the brains of small animal models, 2) determined structures of MeV-F, responsible for neuropathogenesis, alone and in complex with inhibitors, and 3) identified MuV glycan receptors expressed on neural cells. As results of this year's protects, we confirmed that mutations at specific positions in the MeV-F protein structure induce the generation of mutant viruses that cause neurological infections. We also succeeded structure-guided molecular designs of effective inhibitors for MeV in vitro.

2) Drug discovery research against SARS-CoV-2

The viral surface Spike (S) protein of the SARS-CoV-2 is responsible for the binding to its cellular receptor ACE2 and plays a crucial role in determining host range and cell/tissue tropism. On the flip side, the S protein also plays a pivotal role in the recognition of SARS-CoV-2 by our acquired immune system, which is a humoral and cellular immune response. In particular, information on how antibodies recognize the S protein to neutralize SARS-CoV-2 is important for the development of preventive and therapeutic measures such as vaccines and antibody drugs. To overcome the current situation of COVID-19 worldwide, we have established a system to express and purify a large amount of S protein that exhibits intact trimeric structure. We have also produced an S protein that can be experimentally labeled as desired. As the results, a system has been established to provide it for use in vaccine development, therapeutic drug development, and immunological analysis.

List of Publications

Ikegame S, Hashiguchi T, Hung CT, Rehbach K, Brennand KJ, Takeda M, Lee B. Fitness selection of hyperfusogenic measles virus F proteins associated with neuropathogenic phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *in press*

List of Presentations

Hashiguchi T. Glycan receptors for mumps virus and other paramyxoviruses. T2020 Society for Glycobiology Virtual Meeting, Online, Nov 9-12, 2020.

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 Assoc. Prof.	Masayuki Horie
助 教	牧野 晶子	Assist. Prof.	Akiko Makino

本分野では、2020年4月に生命科学研究科の修士課程1年に岩田美智子と鍋加有佑が入学した。また、同4月に特定助教の小松弓子が退職した。

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、「オルソボルナウイルスの膜糖蛋白質の発現調整による粒子産出機構」と「オルソボルナウイルス属の宿主適応へ関与するヌクレオタンパク質の核局在化シグナルの進化的選択」についての成果を発表した。「オルソボルナウイルスの膜糖蛋白質の発現調整による粒子産出機構」では、大学院博士課程3年の酒井が、Gの発現量による粒子産出への影響を調べるために、G遺伝子欠損REVec (ΔG -REVec) にGの発現を一過性に補完することで回収するシードタイプREVecを用いて、産出されるウイルス粒子を解析した。Gの過剰な発現は、粒子産出自体に影響を与えたが、導入効率の低いREVec粒子の産出をもたらし、適切な開裂と糖鎖修飾により成熟したG、およびREVecがもつウイルスゲノムRNAの粒子への取り込みを阻害した。Gの過剰な発現の副産物である未開裂のGがこれらの原因になることを明らかにした。これらの機構はBoDV-1を含むオルソボルナウイルス属のウイルスで共通したが、カナリアボルナウイルス1型(CnBV-1)のGのみ例外的に、発現量を増加させた場合でも、高い開裂効率および細胞への導入効率を維持した。そして、CnBV-1と近縁であるCnBV-2とのキメラGを用いて、CnBV-1のシグナルペプチドがフーリンとの相互作用を介する高い開裂効率の責任領域であり、そのことが高い導入効率を示す粒子の産出に起因することを明らかにした。本研究により持続感染を成立させるために、ウイルスが自身の膜糖蛋白質の発現を調整することで、免疫機構を逃れ忍びやかに粒子を産出する新たなメカニズムを示した。「オルソボルナウイルス属の宿主適応へ関与するヌクレオタンパク質の核局在化シグナルの進化的選択」では、大学院博士課程4年の小森園が、哺乳類細胞とオルソボルナウイルス属のヌクレオタンパク質にある核局在シグナルが自然選択を受けており、ウイルスの宿主特異性を決定することを示した。オルソボルナウイルスは、異なる脊椎動物種からいくつかの遺伝子型が単離されている。鳥類から分離された、いくつかの遺伝子型のウイルスは哺乳類の細胞株で複製可能であることが明らかになり、鳥類オルソボルナウイルスの人獣共通感染の可能性が示唆されている。本研究では、オルソボルナウイルスの感染性は、ウイルス糖タンパク質とマトリックスタンパク質を介したウイルス侵入段階では決定されないことを明らかにした。さらに、ヌクレ

オタンパク質の核局在シグナル配列が自然淘汰の下で進化し、宿主特異的なウイルスポリメラーゼ活性を決定していることを明らかにした。鳥類オルソボルナウイルスNのNLS配列を持つキメラ哺乳類オルソボルナウイルスは、哺乳類細胞内での伝播効率が低下することを示した。本研究成果は、スクレオタンパク質の核輸送がオルソボルナウイルスの宿主範囲の決定因子であることを示しており、オルソボルナウイルスの進化と宿主適応に関する知見を提供するものである。

(2) ウィルスベクター開発領域では、「伝播型・非伝播型 REVec 投与ラットにおける生体内での発現分布解析」と「タンジェンシャルフローろ過法も用いた非伝播型 REVec の生成法の確立」についての成果を発表した。我々の研究室ではボルナ病ウイルスを基盤とした新規 RNA ウィルスベクター RNA virus-based episomal vector (REVec) を開発した。「伝播型・非伝播型 REVec 投与ラットにおける生体内での発現分布解析」では、特定助教の小松が、REVec の生体内での遺伝子導入能力を評価するために、ラットを用いて伝達型と非伝達型の REVec の生体内分布解析を行った。その結果、頭蓋内への投与により、伝達型では様々な組織で遺伝子発現が確認されたが、非伝達型では脳でのみで発現が認められた。脳内では、ミクログリア、アストロサイト、ニューロンでの発現が確認された。一方、REVec 投与ラットの脳内には CD8 T 細胞の浸潤が観察された。さらに、「タンジェンシャルフローろ過法も用いた非伝播型 REVec の生成法の確立」では、特定助教の小松が、高力価の REVec を回収することを目的に、タンジェンシャルフローろ過 (TFF) 法を採用することで、非伝播型 REVec においても力価を高めることができ、ラット脳内への投与でも持続的に遺伝子を発現させることができることを示した。

(3) 内在性ウイルス研究領域では、「機械学習を用いた RNA ウィルス様配列の同定」について成果発表を行った。生物のゲノムにはウイルス由来の遺伝子配列 (Endogenous viral element: EVE) が多数存在する。EVE の多くは数百～数千万年以上前に生物ゲノムへと組み込まれたことが知られており、古代のウイルスを知るための分子化石である。さらに、一部の EVE は宿主生物の生理機能に重要な役割を果たすことが知られており、ウイルスと生物の共進化を知るための貴重な手がかりとなる。これまでの EVE の検索は、配列類似性検索により行われていた。この手法は既知のウイルスと生物ゲノムの配列類似性に依存するため、未同定のウイルスや絶滅したウイルスに由来する配列を検出することができないという欠点があった。博士研究員の小嶋らは、既知の RNA ウィルスや RNA ウィルス由来の EVE の配列の特徴を用いた機械学習による新規の EVE の検出手法を開発した。さらに、この新規の手法を用いて、従来の検出方法では見つけられなかった RNA ウィルス様配列がヒトゲノムに存在することを明らかにした。本研究によって得られた知見は、古代のウイルスの多様性およびウイルスと宿主の共進化やゲノム進化の解明に有用である。さらには、ヒト以外の生物のゲノムにおいても同様に、未知のウイルス由来の配列が存在することが示唆され、本研究によって開発された手法は、今後の EVE の検索においても有用である。

The research carried out in our group are focused on a negative strand RNA virus replicating in the cell nucleus, bornaviruses. Our projects aim to understand the fundamental mechanisms of the replication and pathogenesis of bornaviruses. In addition, we are investigating the evolutional significance, as well as

function, of endogenous bornaviruses in many mammalian genomes, including humans. Furthermore, we are conducting the development of a novel RNA virus vector using bornavirus for regenerative medicine and gene therapies. In 2020, we conducted research on the following subjects.

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

1) Optimal Expression of the Envelope Glycoprotein of Orthobornaviruses Determines the Production of Mature Virus Particles. Most viruses causing persistent infection produce few infectious particles from the infected cells. Borna disease virus 1, a member of the genus Orthobornavirus, is an RNA virus that persistently infects the nucleus and has been applied to vectors for long-term gene expression. In this study, we showed that, common among orthobornaviruses, excessive G expression does not affect particle production itself but reduces the production of infectious particles with mature G and genomic RNA. This result suggested that limited G expression contributes to suppressing abnormal viral particle production. On the other hand, we found that canary bornavirus 1 has an exceptional G maturation mechanism and produces a high-titer virus. Our study will contribute to not only understanding the mechanism of infectious particle production but also improving the vector system of orthobornaviruses.

2) Evolutionary Selection of the Nuclear Localization Signal in the Viral Nucleoprotein Leads to Host Adaptation of the Genus Orthobornavirus. Previous studies revealed that some genotypes of genus *Orthobornavirus* isolated from avian species can replicate in mammalian cell lines, suggesting the zoonotic potential of avian orthobornaviruses. However, the mechanism by which the host specificity of orthobornaviruses is determined has not yet been identified. In this study, we found that the infectivity of orthobornaviruses is not determined at the viral entry step, mediated by the viral glycoprotein and matrix protein. Furthermore, we demonstrated that the nuclear localization signal (NLS) sequence in the viral nucleoprotein (N) has evolved under natural selection and determines the host-specific viral polymerase activity. A chimeric mammalian orthobornavirus, which has the NLS sequence of avian orthobornavirus N, exhibited a reduced propagation efficiency in mammalian cells. Our findings indicated that nuclear transport of the viral N is a determinant of the host range of orthobornaviruses, providing insights into the evolution and host adaptation of orthobornaviruses.

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

1) In Vivo Biodistribution Analysis of Transmission Competent and Defective RNA Virus-based Episomal Vector. RNA virus-based episomal vector (REVec) is an emerging viral vector system that mediates long-term stable gene expression in variety of cell types in vitro. However, little is known about its tissue tropism and persistence of gene expression in vivo. Here, to evaluate the feasibility of REVec for in vivo gene delivery, we conducted biodistribution analysis of transmission competent REVec and transmission defective ΔG -REVec in Lewis rats. Following intracranial administration of REVec, transgene expression was detected in various tissues. In contrast, transgene expression was only observed in the brain after ΔG -REVec administration. In the brain, microglia, astrocytes and neurons were susceptible to REVec-mediated transduction. Additionally, CD8 T cell infiltration was observed in the brain of these animals.

2) Production of High-titer Transmission-defective RNA Virus-based Episomal Vector Using Tangential

Flow Filtration. In recent years, viral vector based in vivo gene delivery strategies have achieved a significant success in the treatment of genetic diseases. ΔG-REVec is a nontransmissive gene delivery system that enables long-term gene expression in a variety of cell types in vitro, yet in vivo gene delivery has not been successful due to the difficulty in producing high titer vector. The present study showed that tangential flow filtration (TFF) can be effectively employed to increase the titer of ΔG-REVec. Concentration and diafiltration of ΔG-REVec using TFF significantly increased its titer without loss of infectious activity. Importantly, intracranial administration of high titer vector enabled persistent transgene expression in rodent brain.

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

1) Identification of RNA virus-like sequences using machine learning. Our genomes contain many sequences derived from viruses, called EVEs. Many EVEs are reported to have been integrated into genomes of eukaryotes hundreds to tens of millions of years ago, and thus can be molecular fossils for understanding ancient viruses. Further, some EVEs play important roles in the host organisms, providing valuable insights into the coevolution of viruses and non-viral organisms. Sequence similarity searches, such as BLAST, were used for detection of EVEs in eukaryotic genomes. Such conventional EVE searches are dependent on sequence similarities between known viruses and genomes of eukaryotes, and thus have the disadvantage that they cannot detect EVEs derived from unidentified or extinct viruses. To overcome the problem, we developed a novel method for detecting EVEs by machine learning using sequence signatures of known RNA viruses and their EVEs. Using this novel method, we identified RNA virus-like sequences in the human genome that could not be found using the conventional detection methods. These findings will contribute to elucidating the diversity of ancient viruses, the coevolution of viruses and hosts, and genome evolution. Further, our results suggest that unidentified virus-derived sequences are present in the genomes of non-human organisms as well, and the method developed in this study will be useful in future works.

List of Publications

- 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.
- Komatsu Y, Tanaka C, Komorizono R, Tomonaga K. (2020). In vivo biodistribution analysis of transmission competent and defective RNA virus-based episomal vector. **Sci Rep.** 10 (1):5890.
- Hirai Y, Domae E, Yoshikawa Y, Tomonaga K. (2020). Differential roles of two DDX17 isoforms in the formation of membraneless organelles. **J Biochem.** 168 (1):33-40.
- Komatsu Y, Kakuya Y, Tomonaga K. (2020). Production of high-titer transmission-defective RNA virus-

- based episomal vector using tangential flow filtration. **Microbiol Immunol.** 64 (9):602-609.
- Kim K, Yamamoto Y, Nakaoka S, Tomonaga K, Iwami S, Honda T. (2020). Modeling Borna Disease Virus In Vitro Spread Reveals the Mode of Antiviral Effect Conferred by an Endogenous Bornavirus-Like Element. (2020). **J Virol.** 94 (21):e01204-20.
- Komorizono R, Sassa Y, Horie M, Makino A, Tomonaga K. (2020). Evolutionary Selection of the Nuclear Localization Signal in the Viral Nucleoprotein Leads to Host Adaptation of the Genus Orthobornavirus. **Viruses.** 12 (11):1291.
- Komatsu Y, Tomonaga K. (2020). Reverse genetics approaches of Borna disease virus: applications in development of viral vectors and preventive vaccines. **Curr Opin Virol** 44:42-48.
- 朝長啓造. 特集「レトロトランスポゾンと内在性ウイルス」医学のあゆみ (2020)

List of Presentations

堀江真行、佐々悠木子、川崎純菜、小嶋将平、朝長啓造「公共データベースを用いたマイナス鎖 RNA ウィルスの網羅的な探索」9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月 20-22日

Garcia BC, Horie M, Kojima S, Tomonaga K. Ribosomal methyltransferase BUD23-TRMT112 is involved in the host chromosomal attachment of Borna disease virus. 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月 20-22日

神田雄大、堀江真行、小松弓子、朝長啓造「Back-priming によるボルナ病ウイルスのゲノム 3' 末端配列の多様化とゲノム複製効率への影響」9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月 20-22日

Mukai Y, Horie M, Kobayashi Y, Kojima S, Maeda K, Tomonaga K. A bornavirus-derived gene in miniopterid bat genome encodes a multifunctional RNA-binding protein. 第4回京都生体質量分析研究会シンポジウム、2020年2月19日（京都）

Garcia BC, Horie M, Kojima S, Tomonaga K. Ribosomal methyltransferase BUD23-TRMT112 is involved in the host chromosomal attachment of Borna disease virus. 第4回京都生体質量分析研究会シンポジウム、2020年2月19日（京都）

堀江真行「公共データベースを利用した現代と古代の RNA ウィルス叢の探索」日本進化学会第22回オンライン大会、Web、2020年9月6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、Nicholas F. Parrish 「Detection of virus insertions in human genomes: What we understand from k-mer occurrence. ヒトゲノムにおけるウイルス配列挿入の歴史 : k-mer 出現頻度から読み解く」日本進化学会第22回オ

ンライン大会、Web、2020年9月6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解析：中生代から現代にわたるボルナウイルス感染履歴の追跡」第163回日本獣医学会学術集会、Web、2020年9月14日

朝長啓造「新型コロナウイルスワクチン開発の現状と展望」日本学術会議主催学術フォーラム「新型コロナウイルス感染症コントロールに向けての学術の取り組み」、Web、2020年11月28日

Horie M, Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Wada K, Watashi K, Tomonaga K. A large-scale metaviromic analysis contributed to a deeper understanding of the evolution viruses: An example of deltaviruses in vertebrates. 第43回日本分子生物学会年会、Web、2020年12月2日

Makino A. Evolutionary strategy of an RNA virus to survive with low population density. 第43回日本分子生物学会年会、Web、2020年12月2日

Kawasaki J, Kojima S, Mukai Y, Tomonaga K, Horie M. Comprehensive analysis of viral fossil records to infer the history of RNA viral infections on a geological timescale. 第43回日本分子生物学会年会、Web、2020年12月2日

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

微細構造ウイルス学分野

Laboratory of Ultrastructural Virology

教 授	野田 岳志	Prof.	Takeshi Noda
助 教	中野 雅博	Assist. Prof.	Masahiro Nakano
助 教	村本裕紀子	Assist. Prof.	Yukiko Muramoto
特定助教	杉田 征彦	Project Assist. Prof.	Yukihiko Sugita

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。2020年は、インフルエンザウイルスのゲノム複製機構の解明を目的として、ウイルスリボ核タンパク質複合体の形成の場について解析した。また、マールブルグウイルスのヌクレオキヤプシド形成機構を明らかにするため、ウイルス核タンパク質-RNA複合体の三次元構造を決定した。

1) インフルエンザウイルスの核内複製機構の解析

インフルエンザウイルスは他の多くのマイナス鎖RNAウイルスと異なり、感染細胞の核内でゲノムRNAを複製する特徴的な増殖様式をもつ。核内で複製されたゲノムRNAはRNA依存性RNAポリメラーゼ複合体と核タンパク質(NP)とともに螺旋状のリボ核タンパク質複合体(RNP)を形成する。このRNP構造はゲノムRNAの複製に必須であるが、細胞核内のどこで形成されるのかは分かっていない。本研究では感染細胞核内のどの領域でRNPが形成されるかを明らかにするため、感染細胞におけるNPおよびRNAポリメラーゼ構成因子の細胞内局在を経時的に解析した。インフルエンザウイルス感染細胞においては、感染初期から中期にかけてNPおよびRNAポリメラーゼ構成因子が核小体に局在することが明らかになった。次に、NPの核小体移行シグナル(NoLS)に変異を導入した変異体($NP^{NoLSmut}$)およびその復帰変異体($NoLS-NP^{NoLSmut}$)を発現するプラスミドを作製し、RNAポリメラーゼタンパク質発現プラスミドおよびゲノムRNA発現プラスミドとともに培養細胞に導入し、RNPを再構成した。RNPから合成される新規ゲノムRNA量をRT-qPCRで、RNP形成能を高速原子間力顕微鏡で評価した。 $NP^{NoLSmut}$ を用いてRNPを再構成した時、ゲノムRNAはほとんど合成されず、 $NP^{NoLSmut}$ から構成されるRNPは、野生型RNPと異なる構造を示した。一方、 $NoLS-NP^{NoLSmut}$ を用いて再構成したRNPから合成されるゲノムRNA量は、野生型NPを用いて再構成したRNPから合成されるゲノムRNA量と同等まで復帰し、 $NoLS-NP^{NoLSmut}$ から構成されるRNPは、野生型RNP複合体と同様の構造を示した。これらの結果から、NPの核小体移

行が転写・複製能を有する機能的 RNP 複合体の形成に必須であることが明らかとなり、核小体が RNP 形成の場となる可能性が示された。

2) マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の構造解析

マールブルグウイルスはエボラウイルスと同じフィロウイルス科に属し、非分節のマイナス鎖一本鎖 RNA をゲノムとして持つ。マールブルグウイルスのゲノム RNA は、多数のウイルス核タンパク質 (NP) と結合して螺旋複合体 (NP-RNA 複合体) を形成する。さらに、ウイルスピリメラーゼを含む複数のウイルスタンパク質が NP-RNA 複合体に結合し、スクレオキヤプシドとなってウイルス粒子内に取り込まれる。この NP-RNA 複合体はゲノム RNA の転写・複製の足場として機能するだけでなく、ウイルス粒子形成にも中心的な役割を果たす。しかし、その詳細な分子構造は明らかになっていなかった。そこで本研究では、マールブルグウイルスのスクレオキヤプシド形成機構を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法を用いて NP-RNA 複合体の構造解析を行った。その結果、 3.1 \AA の分解能で NP-RNA 複合体の三次元構造を解くことに成功した。この構造をもとに、点変異体を用いたレポーターアッセイによりマールブルグウイルスの粒子形成やゲノム転写・複製に重要と考えられるアミノ酸残基を同定した。また、これらのアミノ酸はエボラウイルスにも保存されており、エボラウイルス点変異体を用いた解析からも同様の結果を得た。これらの結果から、フィロウイルスのスクレオキヤプシド形成やゲノム転写・複製に重要なアミノ酸が明らかになった。

Virus infections are accompanied by numerous morphological changes in viral and cellular components. Our laboratory aims to elucidate the replication mechanism of influenza, Ebola and Lassa viruses from the ultrastructural point of view, by using different microscopic analytical methods such as electron microscopy and high-speed atomic force microscopy. In 2020, we analyzed intranuclear sites for influenza A virus ribonucleoprotein complex formation in order to elucidate the mechanism for genome replication. Furthermore, we determined Marburg virus nucleoprotein-RNA 3D structure using cryo-EM.

1) The intranuclear site of influenza virus replication

Unlike most RNA viruses, influenza virus replicates genomic RNA in the nucleus of infected cells. This genomic RNA forms a helical ribonucleoprotein complex (RNP) with multiple nucleoproteins (NP) and a heterotrimeric RNA-dependent RNA polymerase complex composed of PB2, PB1, and PA. The RNP is responsible for the replication and transcription of the genomic RNA. Newly synthesized RNP components are assembled into RNPs within the nucleus during replication. However, it remains unclear which intranuclear sites are important for RNP formation. We found that all RNP proteins localized in the nucleoli of infected cells. To further understand the significance of RNP nucleolar localization, we examined the RNP formation and genome replication using NPs with mutations in the nucleolar localization signal (NoLS). Two NP mutants were designed: 1) NP^{NoLsmut} with alanine mutations in the NoLS and 2) a reverse mutant where

intact NoLS is fused to the N-terminus of NP^{NoLSmut}. The RNPs comprising either NP mutant were reconstituted in HEK293T cells, which were immunoprecipitated and visualized by high-speed atomic force microscopy. We found that the mutant RNPs reconstituted with NP^{NoLSmut} formed aberrant RNP structures and exhibited markedly reduced replication activity. On the other hand, the RNPs reconstituted with wild-type NP and the reverse mutant NP formed intact helical RNP structures and showed efficient replication activity. These results demonstrate that the nucleolar localization of NP is critical for the formation and function of RNPs. Our findings suggest that the nucleoli of infected cells are the sites of RNP formation during influenza virus replication.

2) Cryo-EM structure of Marburg virus NP-RNA complex

Marburg virus (MARV), a close relative of Ebola virus (EBOV), belongs to the family Filoviridae and possesses a non-segmented, single-stranded, negative-sense RNA genome. The viral genomic RNA is encapsidated by multiple NPs to form a left-handed helical structure. The helical NP-RNA tube acts as a scaffold for the formation of a helical nucleocapsid, where other viral components such as VP30, VP35, VP24, and L are associated. Because the NP-RNA tube is the core structure of the nucleocapsid and crucial for transcription and replication of the viral RNA, elucidation of its structure is important for understanding the mechanisms of MARV transcription and replication as well as developing novel antivirals against MARV. Here, we report the cryo-EM structure of the MARV NP (1-395)-RNA tube structure with a resolution of 3.1 Å. Based on this structural information, we assessed which amino acid residues are crucial for the multiplication mechanism via mini genome assays using NP site-directed mutants of both MARV and EBOV and negative staining of the mutants. These findings are important for understanding the viral propagation mechanism common among Filoviridae.

List of Publications

- Daidoji, T., Kajikawa, J., Arai, Y., Watanabe, Y., Hirose, R., Nakaya, T. (2020) Infection of human tracheal epithelial cells by H5 avian influenza virus is regulated by the acid stability of hemagglutinin and the pH of target cell endosomes. *Viruses* 12, 82.
- Miyamoto, S., Muramoto, Y., Shindo, K., Fujita, Y., Morikawa, T., Tamura, R., Gilmore, J.L., Nakano, M., Noda, T. (2020) vRNA-vRNA interactions in influenza A virus HA vRNA packaging. *bioRxiv* doi: 10.1101/2020.01.15.907295
- Takamatsu, Y., Krähling, V., Kolesnikova, L., Halwe, H., Lier, C., Baumeister, S., Noda, T., Biedenkopf, N., Becker, S. (2020) Serine-arginine protein kinase 1 regulates Ebola virus transcription. *mBio* 11, e02565-19.
- Takamatsu, Y., Kolesnikova, L., Schauflinger, M., Noda, T., Becker, S. (2020) The integrity of the YxxL motif of Ebola virus VP24 is important for the transport of nucleocapsid-like structures and for the regulation

of viral RNA synthesis. **J Virol.** 94, e02170-19.

Gee, P., Lung, M. S. Y., Okuzaki, Y., Sasakawa, N., Iguchi, T., Makita, Y., Hozumi, H., Miura, Y., Yang, L. F., Iwasaki, M., Wang, X. H., Waller, M. A., Shirai, N., Abe, Y. O., Fujita, Y., Watanabe, K., Kagita, A., Iwabuchi, K. A., Yasuda, M., Xu, H., Noda, T., Komano, J., Sakurai, H., Inukai, N., Hotta, A. (2020) Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping. **Nat. Commun.** 11, 1334.

Sha, T.W., Weber, M., Kasumba, D.M., Noda, T., Nakano, M., Kato, H., Fujita, T. (2020) Influenza A virus NS1 optimises virus infectivity by enhancing genome packaging in a dsRNA-binding dependent manner. **Virol. J.** 17 107.

杉田征彦 (2020) エボラウイルスのクライオ電子顕微鏡解析「感染・炎症・免疫」第50卷第2号

杉田征彦 (2020) 病原RNAウイルスの電子顕微鏡解析「顕微鏡」55卷3号

List of presentations

Yukihiro Sugita. Cryo-EM at Institute for Protein Science, Osaka University. Cryo-EM course at OIST, Okinawa, Japan, 5 February, 2020 (招待講演)

野田岳志 ラッサウイルスの侵入阻害薬の探索 第93回日本細菌学会総会、名古屋、2020年2月19-21日 (招待講演)

杉田征彦 試行錯誤の単粒子解析とモデリング クライオ電子顕微鏡画像からの高度情報処理研究会、2020年10月23日 (招待講演)

野田岳志 新型コロナウイルスのウイルス学的特徴 日本学術会議学術フォーラム「新型コロナウイルス感染症コントロールに向けての学術の取り組み」、2020年11月28日 (招待講演)

杉田征彦 Structural studies on negative-strand RNA viruses using cryo-electron microscopy 第43回日本分子生物学会年会シンポジウム「ウイルス研究の多様性：2020から未来へ」、2020年12月2日 (招待講演)

中野雅博、宮本翔、梶川純一、村本裕紀子、野田岳志 NS1欠損インフルエンザウイルス感染により誘導される二本鎖RNAの合成とその細胞内局在 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月19-21日

武長徹、梶川純一、平林愛、高松由基、村本裕紀子、野田岳志 機能既知化合物ライブラリーを用いたラッサウイルス侵入阻害薬の探索 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月19-21日

山形優太朗、村本裕紀子、宮本翔、藤田陽子、中野雅博、野田岳志 クローン培養された欠損干渉インフルエンザウイルスの性状解析 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月19-21日

藤田陽子 クライオ電子顕微鏡法によるマールブルグウイルス NP-RNA 複合体の構造解析 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月19-21日

祝部和也 エボラウイルス NP-RNA 複合体の形成に必要なアミノ酸残基の同定 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月19-21日

杉山葵、蒋欣欣、永野悠馬、前仲勝実、姚閔、杉田征彦、廣瀬未果、Gregory Moseley、尾瀬農之
狂犬病ウイルス P 蛋白質による JAK-STAT シグナル阻害機構の解明 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2020年1月19-21日

平林愛、梶川純一、胡上帆、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志 LCMV 持続感染機構解明のための CLEM 解析 日本顕微鏡学会第76回学術講演会、誌上開催、2020年5月25-27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76回学術講演会、誌上開催、2020年5月25-27日

藤田陽子、杉田征彦、高松由基、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志 クライオ電子顕微鏡法によるマールブルグウイルス NP-RNA 複合体の構造解析 日本顕微鏡学会第76回学術講演会、誌上開催、2020年5月25-27日

平林愛、藤田陽子、村本裕紀子、梶川純一、中野雅博、野田岳志 電子顕微鏡を用いた SARS-CoV-2 の3次元構造解析 日本顕微鏡学会第63回シンポジウム、オンライン開催、2020年11月20-21日

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

がんウイルス分野
Laboratory of Tumor Viruses

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

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

【酒井グループ】

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

1) HPVに関する研究

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

2) Wnt経路の解析

Wnt経路は、発生や発癌に作用している分泌蛋白である。柳川は、WntのCo-receptor, LRP6に結合する蛋白としてKeratin associated protein 13 (Krtap13)を見いだし、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、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てきた。本年はこの野生型HCV1bの感染増殖モデル細胞として、テトラサイクリン（Tet）を培地に加えることで細胞の染色体に挿入された野生型HCV1bゲノムRNAの転写が抑制される培養細胞を樹立した。この細胞は、培地からTetを除くことで、細胞内にこのゲノムRNAが発現された。この細胞を立体培養することで、誘導発現されたこのゲノムRNA複製し、培養液中に感染性粒子の産生が認められた。

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ている。これまでのその作用機序に関する研究からBARD処理によりHBVゲノムから転写されるpgRNAの分解が促進されることが示唆されていた。HBVゲノムの欠失変異体を用いた解析からBARDの標的領域を検討したところ、特定のゲノム領域の存在が必要であることを見出した。また、この領域をレポーター遺伝子に融合させたところ、同様のレポーター発現低下が観察された。一方、この領域からのタンパク質産生を阻害する点変異体を作製したところ、BARDによる抑制効果には影響しないことがわかった。

したがって、HBVゲノムのこの領域にBARDに応答する塩基配列あるいはその二次構造が存在することが示唆された。

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

1) Development of a new culture model system for proliferation 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. In this year, we developed the model culture system of WT HCV1b in which the expression of HCV genome RNA is regulated by tetracycline (Tet). The whole genome of WT HCV1b, KT9 strain, was expressed in the established cells derived from Huh7.5 cells in the absence of Tet, but not in the presence of Tet. The replication of the expressed WT HCV1b genome was confirmed in the 3D culture condition, as well as production of infectious HCV particles in the culture medium.

2) Analysis of molecular mechanism of anti-HBV effect by bardoxolone methyl

We have observed that bardoxolone methyl (BARD), an activator of Nrf2, significantly suppressed the production of extracellular HBV DNA in several HBV culture systems. We obtained heretofore that BARD treatment reduced the amounts of HBV pregenomic RNA (pgRNA), through the HBV pgRNA degradation. The deletion analysis performed to investigate the responsive region of HBV genome to the BARD effect showed the particular region in HBV region was required to the effect. When the region was fused with the reporter gene, the BARD effect was still observed even when the point mutation preventing the production of the protein from the region was introduced, suggesting that the particular RNA sequence or its structure could play an important role in the BARD effect.

List of Publications

Miyayama Y., Lee H., Soong, H-J., Chayama-Abe H., Miki D., Immamua M., Chayama K., Hijikata M. (2020). Comparative study on the replication of HCV1b genome between wild type and cell culture adaptive mutant in regard to sensitivities against anti-HCV drugs, **Microbiol. Immunol.**, 64, 296-303, <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12768>

Akahori Y., Kato H., Fujita T., Moriishi K., Tanaka Y., Watashi K., Immamura M., Chayama K., Wakita T., Hijikata M. (2020). Establishment of a novel hepatitis B virus culture system using immortalized human hepatocytes, **Sci Rep**, 10, 21718, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78655-x>

赤堀祐一、土方 誠 (2020). B型肝炎ウイルス培養系の開発 ウィルス 70, 135-146.

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

研究室の原点である「結核脂質免疫」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を発見し、その基盤解明を進めている。本年度は、リポペプチド提示サル MHC クラス 1 分子をモデルとして、その内因性リガンドを同定するとともにリポペプチド提示の分子機構を解明した。他方、結核肉芽腫の解析を起点として展開してきた好中球とマクロファージの相互作用の研究は、S100A9 分子を切り口として慢性炎症の新しいコンセプトの構築へと結実しようとしている。

1) リポペプチド抗原提示を担う MHC クラス 1 分子の構造と機能

サルエイズモデルにおいて、特定のアカゲザル MHC クラス 1 分子 (Mamu-B*098, Mamu-B*05104) はミリスチン酸修飾を受けた SIV Nef タンパク質の N 末端リポペプチド断片を結合し、リポペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を活性化する (Nat. Commun. 2016, J. Immunol. 2019)。また、Mamu-B*098 を発現したトランスジェニックマウスにおいては、HBV S1 タンパク質に由来するリポペプチドを認識する CTL が存在する (未発表)。さらに、ヒトにおいてもリポペプチドを結合する HLA クラス 1 分子の存在が明らかとなった (未発表)。リポペプチド提示 MHC クラス 1 分子の詳細な解析から、ペプチド提示を担う従来の MHC クラス 1 分子とは異質の特性が明らかとなりつつある。

MHC クラス 1 分子の細胞表面発現は細胞の健全性の指標であり、一定の発現レベルが恒常的に維持される必要がある。ペプチド提示 MHC クラス 1 分子の場合、小胞体膜に発現したペプチド輸送体 TAP を介して細胞質から小胞体内腔に輸送された自己ペプチドを結合することにより安定化し、細胞表面に発現する。従って、その発現は TAP 機能に依存する。一方、Mamu-B*098 分子の細胞表面発現は TAP 機能に依存しないことから、ペプチドとは異なる自己リガンドの存在が推察された。本年度、Mamu-B*098 分子の主要な自己リガンドとしてリゾリン脂質群を同定し、複合体の X 線結晶構造を解明した (J. Biol. Chem. 2020)。ウイルス感染細胞では、リゾリン脂質リガンドがウイルスリポペプチドに置換され、ウイルスリポペプチド特異的 CTL 応答が誘起されると考えられる。

これまでに同定されたウイルスリポペプチド抗原のペプチド長は 4-5 残基であり、従来のペプチド抗原 (8-10 残基) と比較して多様性に乏しく、T 細胞エピトープの構成が不明であった。そこで SIV Nef 4-mer リポペプチド (Myr-GGAI; C14nef4) を結合した Mamu-B*05104 複合体とそれを特異

的に認識する T 細胞受容体 (SN45) の共結晶構造を解明した。その結果、SN45 T 細胞受容体はミリスチン酸とペプチドの接合部に存在するアミド結合を特異的に認識し、ペプチド配列とは直接的な相互作用を構築しないことが明らかとなった (Fig. 1; Int. Immunol. 2020)。このリポペプチド認識の特性は、従来知られている MHC クラス 1 提示ペプチドとは異質であり、むしろ CD1 分子によって提示される脂質抗原の認識機構に近いものである。

2) 好中球 S100A9 によるマクロファージ極性化制御機構

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、S100A9 ノックアウトマウス (A9KO マウス) を活用し、ウシ結核菌ワクチン株である BCG によるマウス感染モデルの解析を行った。その結果、感染早期に活性化した好中球が S100A9 を産生し、感染局所における抗炎症性 M2 マクロファージを積極的に誘導することが明らかとなった。この好中球によるマクロファージ制御は、菌の長期生存を許容する環境構築を示しており、実際、A9KO マウスにおいては BCG の排除が亢進した。今年度、M2 マクロファージの誘導に関わる好中球 S100A9 シグナルの分子基盤を解明するため、BCG 感染マウスから分離した好中球 RNA-seq を行った。その結果、プロスタグラジン合成酵素である Cox2 が S100A9 により発現調節を受けることを突き止めた。実際に、BCG 感染個体から単離した A9KO 好中球のプロスタグラジン E2 産生量は野生型好中球に比べて顕著に低下した。また、Cox2 に対する特異的阻害剤 (セレニシコブ) を BCG 感染マウスに投与することで M2 マクロファージが阻害され、結果として BCG 制御が亢進した。今回新たに明らかとなった好中球における S100A9/Cox2 経路は、M2 マクロファージの誘導のみならず、結核の病態形成に強く関与することを示唆する。

結核免疫とがん免疫には共通項が多い。そこで 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。B16BL6 メラノーマ細胞を用いたマウス皮下接種担がんモデルでは、接種部位におけるがんの増殖については、野生型と A9KO マウス間に変化はなかった。一方、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亢進することを見出した。S100A9 によるマクロファージ極性化の制御が、とりわけがん細胞の遠隔転移の局面において重要な役割を果たす可能性を想起し、その分子機構の解明に向けた研究を展開している。

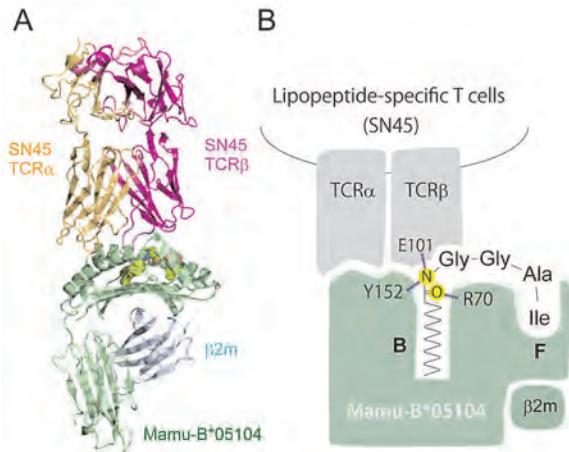


Fig. 1. (A) An overall image of the Mamu-B*05104: C14nef4 lipopeptide: SN45 TCR complex is displayed. (B) A molecular model for TCR recognition of lipopeptides is shown.

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

In a rhesus model of human AIDS, MHC class I molecules (Mamu-B*098 and Mamu-B*05104) bind N-terminal lipopeptide fragments of the N-myristoylated SIV Nef protein and activate lipopeptide-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) (Nat. Commun. 2016; J. Immunol. 2019). CTL responses directed against HBV S1 protein-derived lipopeptides are also detected in Mamu-B*098 transgenic mice (unpublished). Furthermore, MHC (HLA) class I molecules that are capable of binding lipopeptides have been identified in humans (unpublished). Extensive studies of these lipopeptide-presenting molecules are beginning to unravel their unique properties that are distinct from those for peptide-presenting MHC class I molecules.

Sustained surface expression of MHC class I proteins at appropriate levels is critical as an indicator of cell healthiness. Conventional MHC class I complexes are stabilized by binding self peptides that are transported from the cytosol to the endoplasmic reticulum via the TAP peptide transporter and subsequently expressed on the cell surface; therefore, their expression depends on the TAP function. On the contrary, the totally TAP-independent expression of Mamu-B*098 suggests that they may bind endogenous ligands other than peptides. We found that lyso-phospholipid species were utilized as a source of ligands for Mamu-B*098, and X-ray crystal structures of lyso-phospholipid-bound Mamu-B*098 complexes were determined (J. Biol. Chem. 2020).

The peptide portion of lipopeptide antigens is shorter (4- to 5-mer) and less variable than conventional 8- to 10-mer peptide antigens, and it was unknown how lipopeptides were recognized by T-cell receptors (TCRs). An X-ray co-crystal structure of the C14nef4-bound Mamu-B*05104 and specific SN45 TCR complex revealed that the amide bond formed at the myristic acid-peptide junction offered a crucial T-cell epitope while virtually no substantial contribution was noted for the peptide sequence (Fig. 1; Int. Immunol. 2020). These observations highlight novel molecular mechanisms for TCR-mediated recognition of lipopeptide antigens.

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, an organized globular collection of activated macrophages and other immune cells, 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. To address this possibility, 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. The ability of 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.

RNA-sequencing analysis of WT and A9KO neutrophils suggested that S100A9 regulated the Cox2/prostaglandin-E2 pathway, promoting M2 polarization. Moreover, the S100A9/Cox2 axis proved to be essential for bacteria control. Thus, the S100A9-dependent cellular interplay between neutrophils and macrophages may critically dictate host responses against mycobacterial infection. Our recent evidence indicated that this may be of fundamental relevance not only to tuberculosis pathology but also to cancer development.

List of Publications

- Morita, D., Iwashita, C., Mizutani, T., Mori, N., Mikami, B., and Sugita, M. (2020). Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides. **Int. Immunol.** 32, 805-810.
- Shima, Y., Morita, D., Mizutani, T., Mori, N., Mikami, B., and Sugita, M. (2020). Crystal structures of lysophospholipid-bound MHC class I molecules. **J. Biol. Chem.** 295, 6983-6991.
- Mizutani, T., Ohba, Y., Mizuta, S., Yasuda, J., and Urata, S. (2020). An antiviral drug screening platform with a FRET biosensor for measurement of arenavirus Z assembly. **Cell Struct. Funct.** 45, 155-163.
- 杉田昌彦 (2020). MHC クラス 1 分子によるリポペプチド抗原提示 臨床免疫・アレルギー科 74, 434-439.

List of Presentations

- Yamato, Y., Mizutani, T., and Sugita, M. The neutrophil S100A9 protein controls B16 melanoma metastasis. The 18th International Student Seminar, Kyoto, March 4-5, 2020.
- Yamato, Y., and Mizutani, T. S100A9 inhibits the melanoma growth through M1-TAM activation. The 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Hiroshima, October 1-3, 2020.
- Morita, D., Iwashita, C., and Sugita, M. T-cell recognition of the lipopeptide-bound MHC class I complex; evidence from the crystal structure. The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences, Gunma, November 5-6, 2020.

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) インターロイキン7受容体下流シグナルの競合によるT細胞の制御機構を解明

インターロイキン7(IL-7)はT細胞、B細胞、自然リンパ球などリンパ球の分化と恒常性維持に必須なサイトカインである。IL-7受容体(IL-7R)のシグナル伝達において、STAT5とPI3キナーゼが重要な役割を担っている。しかし、この2つの因子がどのようにIL-7シグナルを制御し、機能を発揮するのかは明らかにされていなかった。そこで、私たちはIL-7Rの449番目のチロシン残基がSTAT5とPI3キナーゼとの結合と活性化に必要であること、452番目のメチオニン残基がPI3キナーゼとの結合に必要であることに着目し、2種類のIL-7R点変異マウスを作製した。STAT5とPI3キナーゼの両方のシグナル伝達が障害されるIL-7R-Y449Fマウスと、PI3キナーゼのシグナル伝達が低下するIL-7R-M452Lマウスである。IL-7R-Y449Fマウスでは、STAT5とPI3キナーゼシグナルが障害されたことにより、T細胞分化や生存に関わる遺伝子の発現が低下し、その結果T細胞が大きく減少した。一方、IL-7R-M452Lマウスでは、PI3キナーゼシグナルが障害されただけではなく、STAT5シグナルが著しく亢進した。したがって、STAT5とPI3キナーゼの間に競合的なシグナル伝達が起きていると考えられた。さらに、IL-7R-M452Lマウスの解析により、この競合的なシグナルが初期T細胞の分化、末梢T細胞数の維持、Th17細胞分化を調節していることを見出した。また、リステリア菌を用いた感染実験により、この競合的なシグナルが記憶CD8T細胞の分化と成熟にも関与していた。以上の解析により、IL-7Rの下流シグナルにおいてSTAT5とPI3キナーゼが競合的な関係にあり、この競合性がT細胞の分化、維持と機能を適切に制御していることを明らかにした。

2) 一部の $\gamma\delta$ T細胞サブセットの末梢でのホメオスタシスにTCRシグナルが必要である

$\alpha\beta$ T細胞の末梢組織での生存維持(ホメオスタシス)には、T細胞抗原受容体(TCR)シグナルとIL-7シグナルの2つが必須である。一方、 $\gamma\delta$ T細胞は、CD27の発現によってIFN- γ 産生型(CD27 $^+$)

と IL-17A 産生型 ($CD27^-$) に分けられが、IFN- γ 産生型 $\gamma\delta$ T 細胞のホメオスタシスには IL-15 が、IL-17A 産生型 $\gamma\delta$ T 細胞のホメオスタシスには IL-7 が必要である。しかし、 $\gamma\delta$ TCR からのシグナルが $\gamma\delta$ T 細胞の末梢でのホメオスタシスに必要なのかは明らかになっていない。我々は、 $\gamma\delta$ TCR の発現レベルを低下させることで、 $\gamma\delta$ TCR シグナルが $\gamma\delta$ T 細胞のホメオスタシスに与える影響を調べることができるのでないかと考え、 $TCR\gamma$ 遺伝子座のエンハンサーの 1 つである $E\gamma 4$ を欠損させた ($E\gamma 4KO$) マウスを作製した。 $E\gamma 4KO$ マウスの解析から、 $E\gamma 4$ は近接する $V\gamma 1.1$ 遺伝子の V-J 組換えには必須であるが、遠位にある $V\gamma 2$ 遺伝子（二次リンパ組織の主要な $\gamma\delta$ T 細胞に発現する $TCR\gamma$ 遺伝子）の V-J 組換えには影響を与えず、転写のみを促進するエンハンサーとして働くことが分かった。さらに、 $E\gamma 4KO$ マウスでは、胸腺の $V\gamma 2^+ \gamma\delta$ T 細胞の細胞数は野生型マウスとの間で差がみとめられないものの、リンパ節と脾臓では $V\gamma 2^+ \gamma\delta$ T 細胞が減少していることを見出した。 $\gamma\delta$ T 細胞は $CD27$ と $CD45RB$ の発現によって 4 つの subpopulation に分けられる。 $E\gamma 4KO$ マウスでは $CD27^+CD45RB^{high}$ IFN- γ 産生型 $V\gamma 2^+ \gamma\delta$ T 細胞が特異的に減少していることが分かった。そこで、 $E\gamma 4KO$ マウスのリンパ節と脾臓から $CD27^+CD45RB^{high}$ $V\gamma 2^+ \gamma\delta$ T 細胞サブセットを単離して調べたところ、野生型マウスの同サブセットと比較して、 TCR の転写、細胞表面発現レベル、 TCR シグナルの強度の指標である $Nr4a1$ と $Egr-3$ の発現が低下していることが分かった。すなわち、 $E\gamma 4KO$ マウスでは $V\gamma 2$ 遺伝子の転写が低下することにより、 $\gamma\delta$ TCR 発現と $\gamma\delta$ TCR シグナルが減弱していることが確認された。さらに、野生型マウスと $E\gamma 4KO$ マウスから $CD27^+CD45RB^{high}$ $V\gamma 2^+ \gamma\delta$ T 細胞を単離して 1:1 の割合で混合し、 $Rag2$ 欠損マウスに移植して、4 週間後に解析を行った結果、 $E\gamma 4KO$ マウス由来 $CD27^+CD45RB^{high}$ $V\gamma 2^+ \gamma\delta$ T 細胞は、野生型の同サブセットに比べて維持されにくことが分かった。また、 $E\gamma 4KO$ マウスでは、 $CD27^+CD45RB^{high}$ $V\gamma 2^+ \gamma\delta$ T 細胞の *in vitro* での TCR 刺激による活性化が野生型マウスより減弱しており、メラノーマに対する抵抗性も低下していた。以上の結果から、二次リンパ組織に存在する $CD27^+CD45RB^{high}$ $\gamma\delta$ T 細胞のホメオスタシスには $\gamma\delta$ TCR からのシグナルが必要である可能性が示唆された。

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) Competition between STAT5 and phosphatidylinositol 3-kinase under IL-7 receptor signaling modulates T cell development and homeostasis

IL-7 is a cytokine essential for immune development and homeostasis. STAT5 and PI3K are two major signal molecules of the IL-7 receptor (IL-7R) involved in these processes. The tyrosine residue Y⁴⁴⁹ of IL-7R α is essential for interaction and activation of both STAT5 and PI3K, while the methionine residue M⁴⁵² is additionally required for PI3K recruitment. Nevertheless, how STAT5 and PI3K signals are precisely

contributed under the IL-7R has not been well understood. To characterize the differential roles of these signals in vivo, we established two lines of IL-7R α mutant mice, IL7R-Y449F and IL7R-M452L. Interestingly, IL-7R-Y449F mice showed decreased PI3K and STAT5 signals, whereas IL-7R-M452L mice showed decreased PI3K but significantly increased STAT5 signaling, owing to a competition between PI3K and STAT5 signaling through Y449 of IL-7R α . The Y449F mice showed markedly decreased T cells and mature innate lymphoid cells because of the poor survival and proliferative dysfunction. In contrast, only early T progenitors (ETPs) and DN2 thymocytes were reduced in the M452L mice, due to the reduction of T cell factor (TCF)-1 expression. Peripheral T cell numbers increased in IL-7R-M452L mice with enhanced survival and homeostatic proliferation. Although wild type and IL-7R-Y449F mice showed comparable Th differentiation, IL-7R-M452L mice exhibited impaired Th17 differentiation. Furthermore, development and maturation of memory CD8 T cells were impaired in M452L mice after Listeria infection. Thus, our study suggests that the competition between STAT5 and PI3K for the Y⁴⁴⁹ of IL-7R α modulates the development, homeostasis, and function of T cells in vivo.

2) CD27 $^+$ CD45 $^{\text{high}}$ IFN- γ -producing $\gamma\delta$ T cells require TCR signal for homeostasis in the secondary lymphoid organs

Naive $\alpha\beta$ T cells require TCR and IL-7 signal for homeostasis in the secondary lymphoid organs. $\gamma\delta$ T cells are divided into two subpopulations: IFN- γ - or IL-17A-producers, and survival of IFN- γ - and IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells reportedly depends on IL-15 and IL-7, respectively. However, it remains unknown whether $\gamma\delta$ T cells require TCR signal for homeostasis in the peripheral lymphoid organs. To attenuate $\gamma\delta$ TCR signals, we generated mice lacking E γ 4 ($E\gamma 4^{-/-}$), an enhancer located at the 3'-most end of the TCR γ locus. Enhancers in the immunoglobulin and TCR loci may enhance V(D)J recombination or transcription. We found that in thymus, whereas E γ 4 loss completely abolished proximal V γ 1.1-J γ 4 rearrangement, distal V γ 2-J γ 1 (major V γ gene expressed in $\gamma\delta$ T cells in secondary lymphoid organs) rearrangement was unaffected, suggesting that E γ 4 activates V-J rearrangements of TCR γ locus in a distance-dependent manner. V γ 2 $^+$ $\gamma\delta$ T cells in E γ 4 $^{-/-}$ mice developed normally in both fetal and adult mouse thymi but were reduced in number in spleen and lymph nodes. $\gamma\delta$ T cells can be divided into four subpopulations by CD27 and CD45RB expression. In E γ 4 $^{-/-}$ mice, V γ 2 $^+$ $\gamma\delta$ T cells decreased in peripheral lymphoid organs were limited to the innate-like CD27 $^+$ CD45RB $^{\text{high}}$ IFN- γ producers. In addition, E γ 4 $^{-/-}$ mice showed reduced TCR surface expression, transcription, and Egr-3 and Nr4a expression, markers of TCR signaling, in this subpopulation, suggesting that TCR expression and following TCR signaling are attenuated in E γ 4 $^{-/-}$ mice. Furthermore, CD27 $^+$ CD45RB $^{\text{high}}$ V γ 2 $^+$ $\gamma\delta$ T cells from E γ 4 $^{-/-}$ mice transferred into Rag2-deficient mice were not efficiently recovered compared to E γ 4 $^{+/+}$ mice, suggesting that continuous TCR signaling is required for their homeostasis. Finally, CD27 $^+$ CD45RB $^{\text{high}}$ V γ 2 $^+$ $\gamma\delta$ T cells from E γ 4 $^{-/-}$ mice showed impaired TCR-induced activation ex vivo and E γ 4 $^{-/-}$ mice exhibited weaker anti-tumor responses. Collectively, our results suggest that normal homeostasis of innate-like CD27 $^+$ CD45RB $^{\text{high}}$ V γ 2 $^+$ $\gamma\delta$ T cells in peripheral lymphoid organs requires TCR signaling.

List of Publications

- Cui, G., Shimba, A., Ma, G., Takahara, K., Tani-ichi, S., Zhu, Y., Asahi, T., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Yasunaga, J., Suwanai, H., Yamada, H., Matsuoka, M., Ueki, K., Yoshikai, Y., and Ikuta, K. (2020). IL-7R-dependent phosphatidylinositol 3-kinase competes with STAT5 signal to modulate T cell development and homeostasis. **J. Immunol.** 204, 844-857.
- Zhu, Y., Cui, G., Miyauchi, E., Nakanishi, Y., Mukohira, H., Shimba, A., Abe, S., Tani-ichi, S., Hara, T., Nakase, H., Chiba, T., Sehara-Fujisawa, A., Seno, H., Ohno, H., and Ikuta, K. (2020). Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intraepithelial lymphocytes in the intestine. **Int. Immunol.** 32, 307-319.
- Inokawa, H., Umemura, Y., Shimba, A., Kawakami, E., Koike, N., Tsuchiya, Y., Ohashi, M., Minami, Y., Cui, G., Asahi, T., Ono, R., Sasawaki, Y., Konishi, E., Yoo, S., Chen, Z., Teramukai, S., Ikuta, K., and Yagita, K. (2020). Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice. **Sci. Rep.** 10, 2569.
- Tani-ichi, S., Wagatsuma, K., Cui, G., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., and Ikuta, K. (2020). Innate-like CD27⁺CD45RB^{high} $\gamma\delta$ T cells require TCR signaling for homeostasis in peripheral lymphoid organs. **J. Immunol.** 204, 2671-2684.
- Miyazaki, K., Watanabe, H., Yoshikawa, G., Chen, K., Hidaka, R., Aitani, Y., Osawa, K., Takeda, R., Ochi, Y., Tani-ichi, S., Uehata, T., Takeuchi, O., Ikuta, K., Ogawa, S., Kondoh, G., Lin, Y. C., Ogata, H., and Miyazaki, M. (2020). E2A specifies adaptive immunity by instructing large-scale topological changes for *Rag* gene super-enhancer formation. **Sci. Immunol.** 5, eabb1455.
- Shimba, A. and Ikuta, K. (2020). Glucocorticoids regulate circadian rhythm of innate and adaptive immunity. **Front. Immunol.** 11, 2143.
- Shimba, A. and Ikuta, K. (2020). Immune-enhancing effects of glucocorticoids in response to day-night cycles and stress. **Int. Immunol.** 32, 703-708.
- Shimba, A. and Ikuta, K. (2020). Control of immunity by glucocorticoids in health and disease. **Semin. Immunopathol.** 42, 669-680.
- 榛葉旭恒、生田宏一 (2020). T 細胞の維持と免疫応答における IL-7 受容体の発現制御と機能 臨床免疫・アレルギー科 74, 219-225.

List of Presentations

生田宏一 免疫学の視点からコロナ時代を見る 東京大学医学部 医学序論連続講座シリーズ XX「医の原点」、東京（オンライン）、2020 年 10 月 1 日

Ikuta, K. and Shimba, A. Circadian control of immunity by glucocorticoids、第 43 回日本分子生物学会年会、オンライン（MBSJ2020）、2020 年 12 月 3 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。小胞体で生合成されたタンパク質は正しい高次構造を形成した後分泌経路に入り、本来の機能すべき場所へと運ばれる。コラーゲンは脊椎動物において大量に産生される細胞外マトリックスタンパク質で、骨格形成や臓器の形態形成に重要な働きをしている。コラーゲンは小胞体で生合成された3本の α 鎖がより合わさって長径約300-400 nmの棒状の分子を形成する（Fig. 1A）。このように大きなコラーゲン分子の細胞内輸送メカニズムを解明するため、蛍光タンパク質GFPを付加したコラーゲン分子を作製し、細胞に発現させてその動きを live-cell imaging 法を用いて解析した。IV型コラーゲンは基底膜を形成するコラーゲンで、細胞外に網目状に沈着する（Fig. 1A）。GFP-procollagen IVを作製して小胞体からゴルジ装置への細胞内輸送を観察した結果、直径約300-500 nmの小胞によって輸送されることが明らかになった（Fig. 1B）。この輸送小胞の大きさは、通常の積み荷タンパク質を輸送する小胞とほぼ同じであった。しかし、小胞体-ゴルジ体中間区画(ERGIC)の膜成分を含まないことから、IV型コラーゲンは一般的な分泌タンパク質とは異なる経路で輸送される可能性が示唆された。

また、線維形成性コラーゲンタンパク質の細胞内輸送について研究を進めるとともに、小胞体関連分解（ERAD）を担う膜複合体の解析も行っている。

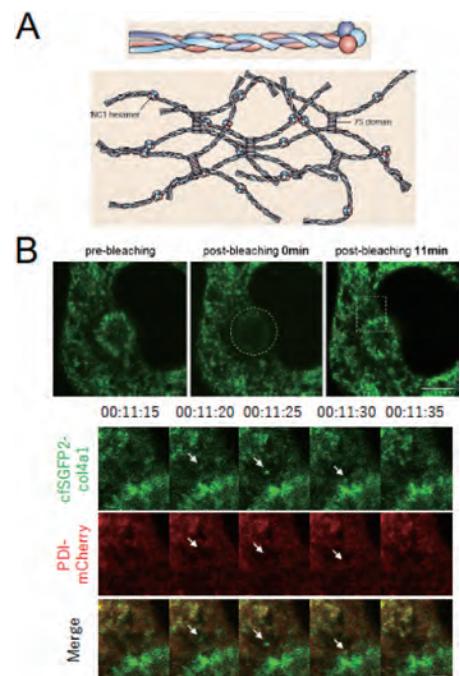


Fig. 1. A. Scheme of collagen IV molecules (Kalluri, 2014). B. ER-to-Golgi transport of GFP-collagen IV.

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発現する過程は、様々な段階での調節を受ける。具体的には、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調節領域への結合、転写開始複合体の形成、転写開始、伸長反応といった段階であり、これらがスムーズに進行しなければならない。このような転写過程のうち、我々が興味を持っているのは、転写開始から本格的な伸長反応へと移行する際の制御機構である。その仕組みについて、ショウジョウバエの Hsp 70 遺伝子などで見られる RNA ポリメラーゼの伸長停止反応（promoter proximal pausing of RNA polymerase II、転写開始後、本格的な伸長反応に入る前の段階のものと考えられる）をモデルに、停止とその解除の機構を明らかにすることでアプローチしたいと考えている。

これまでに、Hsp70 遺伝子の転写に関わる TBP および GAF に対する特異的 aptamer の取得に成功しており、それらを用いた in vitro 転写系での解析から、TBP のプロモーターへの結合は転写を開始した後ではあまり安定的ではないこと、GAF はプロモーターの GAGA 配列依存的な転写開始複合体形成段階での調節と、GAGA 配列非依存的な転写開始後の段階での調節に関わっていることを明らかとした。これらの結果からは、プロモーターにおける転写開始複合体の安定性と停止している複合体との安定性とのバランスが伸長停止に関わっている可能性や、GAF を足場として転写開始から転写伸長反応への切り替えが行われる可能性が示唆される。今後もこれらの因子の機能解析を通して、真核生物の転写制御機構の解明に努めたい。

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1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ことが難しい。我々は現在、I型コラーゲンの α -integrin および PEDF 結合配列を含んだ合成ペプチドを用いて、これらに特異的に結合する RNA aptamer の選別に取り組んでいる。纖維状タンパク質への RNA aptamer の選別はこれまでに報告されていないが、現在までに、SELEX 法により数種類の RNA クローンにまで収束することに成功している。今後は、これらの RNA のペプチドに対する結合や機能阻害について解析を進めていきたい。

3) 今年度も、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 β 鎖遺伝子の非正統的なV(D)J組換えと発がん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 β 鎖遺伝子(*Tcrb*) V(D)J組換え

12/23 rule に反して、V14 セグメントと D1 セグメントが tail-to-tail につながった構造が正常胸腺から検出されたことを昨年報告した。この V14-D1 coding joint (CJ) は、D1-J 再構成の際に非正統

的な J coding end (CE) と 23RSS(D1) signal end (SE) がつながる hybrid joint (HJ) が生じてしまい、続いて V14 と D1 の CE 同士が正統的な反応をしたと考えられる。そこで今年度は、V14 セグメントと D2 セグメントが同様につながった構造の有無について調べた。しかしながら、検出はできなかった。このことは、D2-J よりも D1-J 再構成のときに V14-D tail-to-tail 結合がおこりやすいことを示唆している。実際、D1 と J2.6 の間では、D1 CE と 12RSS(J2.6) SE とがつながった HJ と、12/23 rule に反する J2.2 と J2.6 セグメントが head-to-head に結合した CJ を同時に保持した構造を見出した (Fig. 2)。

二本鎖 DNA 切断の修復で重要な役割を果たしている kinase の 1 つ ATM の欠損マウス胸腺からは、*Tcrb* locus で HJ を容易に検出することができる。われわれが得たデータは、正常胸腺でも、HJ が D1 と J2.6 といった特定のセグメント間で生じることを示している。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、HJ 形成が関与しているのではないだろうか。

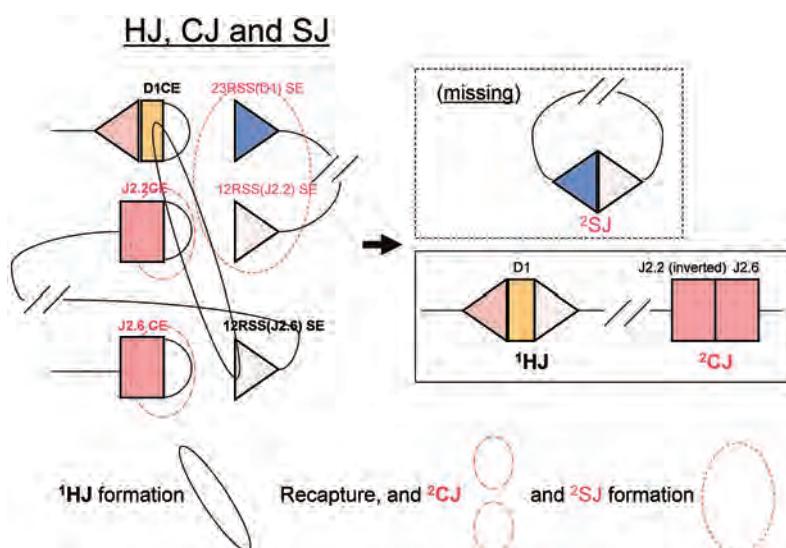


Fig. 2. An illegitimate HJ between D1 CE and 12RSS (J2.6) SE, a head-to-head CJ between J2.2 CE and J2.6 CE, and a SJ between 23RSS (D1) SE and 12RSS (J2.2) SE that is deleted from the genome.

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. Secretory and membrane proteins are synthesized in the ER (endoplasmic reticulum), and only correctly folded proteins are further sorted into the secretory pathway. Collagens are the major extracellular matrix proteins in vertebrates,

and create the frameworks of tissues, organs, and the bodies. Three α -chains of procollagens synthesized in the ER form a triple helix and sorted to the secretory pathway. The procollagen molecule has a rod-like structure of ~300-400 nm in length (Fig. 1A). To elucidate how such large molecules are transported within the cells, we have constructed procollagens tagged with GFP and analyzed the intracellular trafficking by performing live-cell imaging. Type IV collagen is a network-forming collagen and the major component of basement membranes (Fig. 1A). We have elucidated that GFP-procollagen IV was transported from the ER to the Golgi apparatus by vesicles with a diameter of ~300-500 nm (Fig. 1B). These transport vesicles were similar to the carriers containing conventional cargoes in size, however, they did not contain ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) membranes, suggesting that procollagen IV uses a unique mechanism to exit the ER.

We are now analyzing the intracellular transport mechanisms of fibril-forming collagens using live-cell imaging, as well as studying the function of the ERAD (ER-associated protein degradation) complexes in the ER membrane.

2) Our research aims are 1) to investigate the eukaryotic transcriptional regulation mechanism and 2) to analyze the function of collagen molecules. For these purposes, we use RNA aptamers, artificial RNA molecules selected from random RNA pools, as target-specific inhibitors.

① Analysis of the eukaryotic transcriptional regulation mechanism

The process of eukaryotic gene expression is regulated at various levels. It includes nucleosome remodeling, binding of various transcriptional activators to regulatory regions, PIC (preinitiation complex) formation, transcription initiation, and elongation, are these steps proceed smoothly. Among these transcriptional processes, we are interested in the regulatory mechanism of the transition from transcription initiation to elongation. To understand the regulatory mechanism of this transition, we use the promoter proximal pausing of RNA polymerase II observed in the Hsp 70 gene in *Drosophila*, which indicates the intermediate state between initiation and elongation. To clarify how RNA polymerase II stops and goes into elongation phase could give new insight into the mechanism of the transcription regulation.

We have succeeded in obtaining specific aptamers for TBP and GAF, which are involved in the transcription of the *Drosophila* Hsp70 gene. *In vitro* transcriptional analysis using these aptamers showed that TBP on the promoter was not stable after transcription initiation. In addition, GAF was involved in GAGA-dependent regulation at PIC formation stage and GAGA-independent regulation of the post-initiation stage. These results suggest that the balance between the stability of the PIC and that of the paused complex may be involved in the promoter proximal pausing, and that GAF could play a role as a scaffold in the transition from transcription initiation to elongation. We will continue to analyze the functions of these factors to elucidate the mechanisms of transcriptional regulation in eukaryotes.

② Functional analysis of collagen molecules in vivo

Collagen, one of the richest proteins in living organisms, is a fibrous protein that functions as a scaffold for various reactions, including maintaining the structure of the body. Although specific inhibitors such as antibodies are necessary for functional analysis of collagen, because collagen is highly conserved among species, it is difficult to produce highly specific antibodies due to the low immunogenicity of collagen. We are now trying to select RNA aptamers using synthetic peptides containing alpha-integrin and PEDF binding sequences of type I collagen. Although the selection of RNA aptamer to fibrous proteins has not been reported so far, we have succeeded in converging to several RNA clones by SELEX method. We would like to analyze the binding and functional inhibition of these RNAs to peptides.

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

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

We had found an illegitimate tail-to-tail joint, which conflicts with the 12/23 rule, between V14 and D1 from normal thymus last year. This V14-D1 coding joint (CJ) is thought to develop as follows. An unusual hybrid joint (HJ) between J coding end (CE) and 23RSS(D1) signal end (SE) is produced by D1-J recombination event, then the free D1 CE pairs with recaptured V14 CE. Similarly, the other D segment, D2, can form CJ with V14? Intensive examination, however, could not detect the construct, suggesting that D1 is more favorable for HJ formation than D2. In relation to D1-J recombination event, we could find the other HJ between D1 CE and 12RSS (J2.6) SE and a head-to-head CJ between J2.2 and J2.6 on the same allele (Fig. 2).

ATM is one of kinases responsible for the repair of DNA double-strand break. And HJs in *Tcrb* locus had been shown to exist in ATM-deficient thymus. Our data, however, revealed that specific HJs such as one between D1 and J2.6 can be formed even in normal thymus. Some oncogenic DNA joinings occur between two genes both with 12RSS or 23RSS. It is possible that a rare HJ lead to the gene assembly against the 12/23 rule.

List of Publications

- Matsui Y, Hirata Y, Wada I, Hosokawa N.: Visualization of procollagen IV reveals ER-to-Golgi transport by ERGIC-independent carriers. *Cell Struct. Funct.*: **45**, 107-119 (2020). doi: 10.1247/csf.20025
- Hosokawa N. *In vitro* Mannosidase Assay of EDEMs: ER Degradation-Enhancing α -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

細川暢子、和田郁夫：小胞体膜タンパク質 SEL1L 分解産物は細胞質におけるタンパク質凝集体形成に関与する。 (第 72 回日本細胞生物学会大会) (web 開催) (2020.6.9-11、京都市)

Kuiper BP, Hanafusa K, Hosokawa N, Wada I: Photon counting multiple histograms (PCMH) analysis of the ERdj3-SDF2L1 complex. 第 43 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2020 年 12 月 2 日 -4 日、オンライン開催

法邑 賢一、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ト結合配列に対する RNA アプタマーの選別 第43回日本分子生物学会年会 2020年12月2-4日 オンライン開催

藤本真慈 新型コロナウイルスってナニモノ？ 日本禁煙科学会第269回全国禁煙アドバイザー育成講習会、2020 年 7 月 12, 19, 20 日 オンライン開催

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

- Nii T, Makino K, Tabata Y. (2020) A cancer invasion model of cancer-associated Fibroblasts aggregates combined with TGF- β 1 release system. Regenerative Therapy14 196-204
- Nii T, Makino K, Tabata Y. (2020) A Cancer Invasion Model Combined with Cancer-Associated Fibroblasts Aggregates Incorporating Gelatin Hydrogel Microspheres Containing a p53 Inhibitor. Tissue Eng Part C Methods. (12):711-720. doi: 10.1089/ten.TEC.2019.0189.
- 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. (2020) Design, construction, and biological testing of an implantable porous trilayer scaffold for repairing osteoarthritic cartilage. J Tissue Eng Regen Med. Feb;14 (2):355-368. doi: 10.1002/tetm.3001.
- Kuttappan S, Jo JI, Sabu CK, Menon D, Tabata Y, Nair MB. (2020) Bioinspired nanocomposite fibrous scaffold mediated delivery of ONO-1301 and BMP2 enhance bone regeneration in critical sized defect.

Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 110, 110591

- Tsubosaka M, Kihara S, Hayashi S, Nagata J, Kuwahara T, Fujita M, Kikuchi K, Takashima Y, Kamenaga T, Kuroda Y, Takeuchi K, Fukuda K, Takayama K, Hashimoto S, Matsumoto T, Niikura T, Tabata Y, Kuroda R. (2020) Gelatin hydrogels with eicosapentaenoic acid can prevent osteoarthritis progression in vivo in a mouse model. *J Orthop Res.* 38:2157-2169
- Sulaiman S, Chowdhury SR, Fauzi MB, Rani RA, Yahaya NHM, Tabata Y, Hiraoka Y, Binti Haji Idrus R, Min Hwei N. (2020) 3D Culture of MSCs on a Gelatin Microsphere in a Dynamic Culture System Enhances Chondrogenesis. *Int J Mol Sci.* Apr 13;21 (8):2688. doi: 10.3390/ijms21082688.
- Shintani, K., Uemura, T., Takamatsu, K., Yokoi, T., Onode, Ema., Okada, Mitsuhiro., Yasuhiko Tabata, Hiroaki Nakamura. (2020) 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.*;40:377-386
- Fujimoto Y, Yokozeki T, Yokoyama A, Tabata Y. (2020) Basic fibroblast growth factor enhances proliferation and hepatocyte growth factor expression of feline mesenchymal stem cells. *Regenerative Therapy*15 10-17
- Hanamura N, Ohashi H, Morimoto Y, Igarashi T, Tabata Y. (2020) Viability evaluation of layered cell sheets after ultraviolet light irradiation of 222 nm. *Regenerative Therapy*14 344-351
- Ardhani R, Ana ID, Tabata Y. (2020) Gelatin hydrogel membrane containing carbonate hydroxyapatite for nerve regeneration scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 108 (12): 2491-2503
- Nii T, Kuwahara T, Makino K, Tabata Y. (2020) A Co-Culture System of Three-Dimensional Tumor-Associated Macrophages and Three-Dimensional Cancer-Associated Fibroblasts Combined with Biomolecule Release for Cancer Cell Migration. *Tissue Eng Part A.* 26, 1272-1282
- Hihara M, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Lai F, Jo J, Tabata Y, Kusumoto K. (2020) Improved viability of murine skin flaps using a gelatin hydrogel sheet impregnated with bFGF. *J Artif Organs.* (4): 348-357
- Osada H, kawatou M, Takeda M, Jo J, Murakami T, Tabata Y, Minatoya K, Yamashita J K., Masumoto H. (2020) Accuracy of spiked cell counting methods for designing a pre-clinical tumorigenicity study model. Helion <http://doi.org/10.1016/j.heliyon.e04423>
- Inoo K, Yamamoto M, Tabata Y. (2020) Preparation of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres of sugar-responsive water solubilization. *J Tissue Eng Regen Med* 14 (8):1050-1062.
- Takahashi K, Kiso H, Murashima-Suginami A, Tokita Y, Sugai M, Tabata Y and Bessho K. (2020) Development of tooth regenerative medicine strategies by controlling the number of teeth using targeted molecular therapy. *Inflamm Regen.* <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00130-x>
- Ibrahim N. Amirrah, Mohd Farhanulhakim Mohd Razip Wee, Tabata Y, Ruszymah Bt Hj Idrus, Abid Nordin

- and Mh Busra Fauzi. (2020) Antibacterial-Integrated Collagen Wound Dressing for Diabetes-Related Foot Ulcers: An Evidence-Based Review of Clinical Studies. *Polymers*, 12 (9), 2168; doi:10.3390/polym12092168
- Nii T, Makino K, and Tabata Y. (2020) Three-Dimensional Culture System of Cancer Cells Combined with Biomaterials for Drug Screening. *Cancers*, 12 (10), 2754.
- Kai Shen Ooi, Shafieq Haszman, Yon Nie Wong, Emillia Soidin, Nadhirah Hesham, Muhammad Amirul Arif Mior, Tabata Y, Ishak Ahmad, Mh Busra Fauzi and Mohd Heikal Mohd Yunus. (2020) Physicochemical Characterization of Bilayer Hybrid Nanocellulose-Collagen as a Potential Wound Dressing. *Materials* 13 (19): 4352 doi:10.3390/ma13194352
- Miho Watanabe, Haiying Li, Masaya Yamamoto, Jun-ichi Horinaka, Yasuhiko Tabata, Alan W Flake. (2020) Addition of glycerol enhances the flexibility of gelatin hydrogel sheets; application for in utero tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 109 (6): 921-931 DOI: 10.1002/jbm.b.34756
- Mior Muhammad Amirul Arif, Mh Busra Fauzi, Abid Nordin, Yosuke Hiraoka, Yasuhiko Tabata, Mohd Heikal Mohd Yunus. (2020) Fabrication of Bio-Based Gelatin Sponge for Potential Use as A Functional Acellular Skin Substitute. *Polymers*, 12 (11), 2678 DOI: 10.3390/polym12112678
- Matsuno, K., Saotome, T., Shimada, N., Nakamura, K., and Tabata, Y. (2020) Effect of cell seeding methods on the distribution of cells into the gelatin hydrogel nonwoven fabric. *Regen. Ther.* 14, 160–164.
- Maeda, H., Kami, D., Maeda, R., Murata, Y., Jo, J., Kitani, T., Tabata, Y., Matoba, S., and Gojo, S. (2020) TAT-dextran-mediated mitochondrial transfer enhances recovery from models of reperfusion injury in cultured cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 24 (9):, 5007-5020.
- Murata, Y., Jo, J., Yukawa, H., Tsumaki, N., Baba, Y., and Tabata, Y. (2020) Visualization of Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Three-Dimensional Cartilage Tissue by Gelatin Nanospheres. *Tissue Eng Part C Methods*. 26, 244-252.
- Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. (2020) Molecular Beacon Imaging to Visualize Ki67 mRNA for Cell Proliferation Ability. *Tissue Eng Part A*. 27 (9-10): 526-535.
- Nakamura, K., Nobutani, K., Shimada, N., and Tabata, Y. (2020) Gelatin hydrogel-fragmented fibers suppress shrinkage of cell sheet. *Tissue Eng*. 26 (4): 216-224.
- Shintani K, Uemura T, Takamatsu K, Yokoi T, Onode E, Okada M, Tabata Y, Nakamura H. (2020) 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*. Mar;40 (3):377-386. doi: 10.1002/micr.30548.
- Osada, H., Kawatou, M., Takeda, M., Jo, J.I., Murakami, T., Tabata, Y., Minatoya, K., Yamashita, J.K., Masumoto, H. (2020) Accuracy of spiked cell counting methods for designing a pre-clinical

tumorigenicity study model. *Heliyon*. 6 (7):, e04423.

Nagasawa, A., Masumoto, H., Yanagi, S., Kanemitsu, N., Ikeda, T., Tabata, Y., Minatoya, K. (2020) Basic fibroblast growth factor attenuates left-ventricular remodeling following surgical ventricular restoration in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 68 (4):, 311-318.

Yoshimoto, Y., Jo, J.I., Tabata, Y. (2020) Preparation of antibody-immobilized gelatin nanospheres incorporating a molecular beacon to visualize the biological function of macrophages. *Regen Ther.* 14: 11-18.

Kuttappan, S., Jo, J.I., Menon, D., Ishimoto, T., Nakano, T., Nair, S.V., Tabata, Y., Nair, M.B. (2020) ONO-1301 loaded nanocomposite scaffolds modulate cAMP mediated signaling and induce new bone formation in critical sized bone defect. *Biomater Sci.* 8 (3): 884-896.

Hihara, M., Kakudo, N., Morimoto, N., Hara, T., Lai, F., Jo, J., Tabata, Y., and Kusumoto, K. (2020) Improved viability of murine skin flaps using a gelatin hydrogel sheet impregnated with bFGF. *Journal of Artificial Organs* 23:348–357

Fujimoto, Y., Yokozeki, T., Yokoyama, A., and Tabata, Y. (2020) Basic fibroblast growth factor enhances proliferation and hepatocyte growth factor expression of feline mesenchymal stem cells. *Regen. Ther.* 15, 10-17.

Takahashi, K., Kiso, H., Murashima-Suginami, A., Tokita, Y., Sugai, M., Tabata, Y., Bessho K. (2020) Development of tooth regenerative medicine strategies by controlling the number of teeth using targeted molecular therapy. *Inflamm Regen*, 40, 21.

Kawaguchi S, Soma Y, Nakajima K, Kanazawa H, Tohyama S, Tabei R, Hirano A, Handad N, Yamada Y, Okuda S, Hishikawa S, Teratani T, Kunita S, Kishino Y, Okada M, Tanosaki S, Someya S, Yuika Morita, Tani H, Kawai Y, Yamazaki M, Ito A, Shibata R, Murohara T, Tabata Y, Kobayashi E, Shimizu H, Fukuda K, Fujita J. (2020) Intramyocardial transplantation of human iPS cell-derived cardiac spheroids improves cardiac function in heart failure animals. *JACC: Basic to Translational Science*. 19; 6 (3) 239-254.

Tsubosaka, M., Kihara, S., Hayashi, S., Nagata, J., Kuwahara, T., Fujita, M., Kikuchi, K., Takashima, Y., Kamenaga, T., Kuroda, Y., Takeuchi, K., Fukuda, K., Takayama, K., Hashimoto, S., Matsumoto, T., Niikura, T., Tabata, Y., Kuroda, R. (2020) Gelatin hydrogels with eicosapentaenoic acid can prevent osteoarthritis progression in vivo in a mouse model. *J Orthop Res.* 38, 2157-2169.

Kanda, Y., Kakutani, K., Yurube, T., Zhang, Z., Miyazaki, S., Kakiuchi, Y., Takeoka, Y., Tsujimoto, R., Miyazaki, K., Kawamoto, T., Takada, T., Hoshino, Y., Tabata, Y., Kuroda, R. (2020). A novel topical treatment for bone metastases using a gelatin hydrogel incorporating cisplatin as a sustained release system. *J. Orhop. Res.* 39 (3): 525-535.

Shamsul Sulaiman., Shiplu Roy Chowdhury., Mh Busra Fauzi., Rizal Abdul Rani., Nor Hamdan Mohamad

Yahaya., Tabata, Y., Hiraoka, Y., Ruszymah Binti Haji Idrus., Ng Min Hwei. (2020) 3D Culture of MSCs on a Gelatin Microsphere in a Dynamic Culture System Enhances Chondrogenesis. Int J Mol Sci. 13;21 (8):2688. doi: 10.3390/ijms21082688.

城潤一郎、田畠泰彦（2020）オートファジー制御・検出におけるバイオマテリアルの役割 .バイオマテリアル 38-3、178-183

田畠泰彦（2020）次世代高機能材料の動向（&）～バイオ機能材料～ Yano E Plus（矢野経済研究所）

田畠泰彦(2020)バイオマテリアルが具現化する先進医療 - 細胞外マトリクスを利用した再生治療 - .眼薬理 vol.34 NO.1,7-19

List of Presentations

海外での招待講演

Y, Tabata. 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, Jan14-18, 2020

Y, Tabata. T, Gloriant., Paolo Falcone., D, Mantovani., Guanjun Yuan. Advanced Materials & Surface Treatments for Bioengineering Applications. THERMEC'2020.Vienna, Austria, May31-June5, 2020

Y, Tabata. Significance of DDS Biomaterial Technologies in Regenerative Medicine. Zhejiang University. Hangzhou, China, July 29, 2020

Y, Tabata. Drug Delivery Technologies for Future Advanced Medical Treatment. LINK-J & UC San Diego Joint Webinar Series #1 with Kyoto University "Front-Line Nano-Engineering and Drug Delivery Technologies" online, December 18, 2020

Jo, J.I., Tabata, Y. Preparation of polymer nanoparticles surface-modified with lysophosphatidylcholine and lipopolysaccharide for an enhanced anti-tumor effect. 11th World Biomaterials Congress, Virtual, Dec 11-15, 2020.

Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. Molecular beacon imaging for energy metabolic pathway of cells. 11th World Biomaterials Congress, Web, December 11-15, 2020.

Osada, H., Masumoto, H., Kawatou, M., Ikeda, T., Tabata, Y., Minatoya, K., Yamashita, J.K. Therapeutic Potential of Clinical Grade Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiac Tissues for a Rat Myocardial Infarction Model: A Pre-clinical Study for a Cell Transplantation Therapy. American Heart Association Scientific Sessions 2020, Web, November 13-17, 2020.

Osada, H., Masumoto, H., Kawatou, M., Ikeda, T., Tabata, Y., Minatoya, K., Yamashita, J.K. Transplantation of clinical-grade human induced pluripotent stem cell derived cardiac tissues contributes to functional

recovery in a rat myocardial infarction model. European Society of Cardiology Congress 2020, Web, August 29 – September 1, 2020.

Kanda, Y., Kakutani, K., Yurube, T., Zhang, Z., Kakiuchi, Y., Takeoka, Y., Tsujimoto, R., Miyazaki, K., Takada, T., Tabata, Y., Kuroda, R. The local administration of gelatin hydrogel microspheres incorporating cisplatin enhanced anti-tumor effects with less side effects in vivo bone metastasis model. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Phoenix, February 8-11, 2020.

Tsubosaka, M., Hayashi, S., Kihara, S., Takashima, Y., Kamenaga, T., Kikuchi, K., Fujita, M., 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 2020 Annual Meeting, Phoenix, February 8-11, 2020.

国内でのシンポジウム招待講演

田畠泰彦 薬剤学 I V (薬物送達学). 北海道大学大学院薬学研究院薬剤分子設計学講義、北海道、2020年1月20日

田畠泰彦 バイオマテリアル技術でますます広がるライフサイエンス - 再生治療と再生研究 -. 生化学若い研究者の会 近畿支部、大阪、2020年1月25日

田畠泰彦 Biomaterials Technology is Essential to Regenerative Medicine. 大学院教育コース『117th 再生医療・臓器再建医学コースミーティング』、京都、2020年2月7日

田畠泰彦 再生医療における細胞環境の重要性 . 株式会社日本生物製剤講演、東京、2020年2月21日

田畠泰彦 最近の世界動向から再生医療ビジネスを考えてみよう . 再生医療ビジネス参入促進オンラインseminar、WEB、2020年6月24日

田畠泰彦 バイオマテリアル技術からみた再生医療-凍結乾燥技術の役割-. 「凍結乾燥の最適な条件設定による品質の安定化」発刊記念セミナー、東京、2020年10月9日

田畠泰彦 自然治癒力を高める再生医療からみたライフサイエンス・メディカルイノベーション .LFPI 第24回定期総会 関西シンポジウム 2020、大阪、2020年10月28日

田畠泰彦 対象が細胞まで広がったバイオテクノロジー分野～再生医療を具現化する細胞バイオテクノロジー～ . ウェルネスシンポジウム、京都、2020年12月4日

国内での一般演題

田畠泰彦 最先端医療を支えるバイオマテリアル . Biomaterials Indispensable for Advanced Medical Therapy. 神戸大学大学院講義、神戸、2020年2月6日

田畠泰彦 生体機能性高分子 - からだを治すポリマー - (生物医学研究から先端医療を支える高分子技術).KIPS 高分子講座、京都、2020年2月12日

- 田畠泰彦 細胞機能の調節とイメージングのための組織工学技術 . 第 19 回日本再生医療学会総会、WEB、2020 年 5 月 18 日 -29 日
- 田畠泰彦 再生医科学 . 同志社大学生命医科学講義、WEB、2020 年 7 月 17 日
- 田畠泰彦 自然治癒力を高める再生医療からみたライフサイエンス・メディカルイノベーション .LFPI 関西シンポジウム 2020、WEB、2020 年 10 月 28 日
- 城潤一郎、田畠泰彦 マクロファージの生物機能を制御・検出するナノバイオマテリアルの開発 第 41 回日本炎症・再生医学会、ハイブリッド（東京 + オンライン）、2020 年 7 月 8-9 日
- 城潤一郎、村田勇樹、田畠泰彦 細胞機能イメージングに必要なドラッグデリバリー・システムの開発、第 69 回高分子討論会、WEB、2020 年 9 月 16-18 日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 モレキュラービーコンの細胞内導入技術に基づく細胞の代謝機能イメージング 第 19 回日本再生医療学会総会、横浜、2020 年 3 月 12-14 日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 モレキュラービーコンを用いた未分化・分化細胞のエネルギー代謝経路の可視化 日本分子イメージング学会 WEB 開催臨時大会、WEB、2020 年 5 月 26 日 -6 月 8 日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 モレキュラービーコンによる未分化・分化細胞のエネルギー代謝経路イメージング 第 36 回日本 DDS 学会学術集会、神戸、2020 年 8 月 28-29 日
- 中村耕一郎、延谷公昭、島田直樹、田畠泰彦 ゼラチンハイドロゲル断片化纖維を利用した細胞シートの収縮抑制 第 19 回日本再生医療学会総会、横浜、2020 年 3 月 12-14 日
- 新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 「3 次元培養と DDS 技術の融合」によるがん浸潤現象の試験管内での再現 日本薬学会第 140 年会、京都、2020 年 3 月 25-28 日
- 新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 DDS 技術を組み込んだがん浸潤・転移を再現するための細胞培養法の創出～再生医療への薬学分野の 1 つの貢献～ 日本薬剤学会第 35 年会、熊本、2020 年 5 月 14-16 日
- 新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 創薬研究のための組織工学技術を組み込んだ 3 次元細胞培養法のデザイン 第 19 回日本再生医療学会総会、神奈川、2020 年 5 月 18-29 日
- 新居輝樹、桑原寿江、牧野公子、田畠泰彦 がん関連マクロファージの 3 次元培養とスクリーニングモデルへの応用 第 41 回日本炎症・再生医学会、東京、2020 年 7 月 8-9 日
- 新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 TGF- β 1 徐放を活用したがん浸潤の試験管内での再現 第 36 回日本 DDS 学会学術集会、神戸、2020 年 8 月 28-29 日
- 江見翼、城 潤一郎、田畠 泰彦 薬物デリバリーを指向した血小板と乳酸グリコール酸共重合体ナノ粒子との相互作用の検討 第 36 回日本 DDS 学会学術集会、神戸、2020 年 8 月 28-29 日
- 小林眞司、矢吹 雄一郎、安村 和則、福井 厚子、新保 裕子、田中 祐吉、前川 二郎、城 潤一郎、田

畠 泰彦 口唇口蓋裂に対する乳児多血小板血漿 / フィブリンの骨形成に対する促進作用 第 12 回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会、WEB、2020 年 12 月 20 日

高橋克、杉並亜希子、喜早ほのか、三島清香、時田義人、高木淳一、田畠泰彦、菅井学、別所和久 USAG-1 を標的分子とした歯数制御による歯の再生治療薬の開発、第 19 回 日本再生医療学会 総会、Web (東京)、2020 年 5 月 18-29 日

杉並亜希子、喜早ほのか、時田義人、田畠泰彦、高木淳一、菅井学、別所和久、高橋克 歯数制御による歯の再生治療薬の開発、第 41 回 日本炎症・再生医学会、Web (東京)、2020 年 7 月 16 日 -8 月 16 日

神田裕太郎、角谷賢一朗、張鍾穎、由留部崇、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 徐放化シスプラチン局所投与による新たな脊椎転移制御の試み -マウス 骨転移モデルでの検討 - 第 49 回脊椎脊髄病学会学術集会、神戸、2020 年 9 月 7-9 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新たな骨転移治療、第 53 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2020 年 9 月 11-30 日

神田裕太郎、角谷賢一朗、由留部崇、張鍾穎、山本潤哉、垣内裕司、武岡由樹、辻本龍、宮崎邦彦、大西洋輝、高田徹、田畠泰彦、黒田良祐 がん骨転移局所制御に対する徐放化抗がん剤の有効性と安全性についての検討、第 10 回 DDS 再生医療研究会、2020 年 12 月 20 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、いろいろの系列の单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の支援を受けて拒絶されにくい他家T細胞製剤を作るプロジェクトを始めた。2020年度は、世界中で新型コロナウイルスが猛威を奮った。我々は、再生T細胞製剤を新型コロナウイルス感染症に応用する研究を開始した。

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。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、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、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。

2) 新型コロナウイルス感染症の治療薬としての T 細胞製剤の開発

再生 T 細胞製剤はがんだけでなくウイルス感染症にも使える。新型コロナウイルスに特異的な TCR 遺伝子をクローニングし、TCR-iPS 細胞法を用いて T 細胞製剤を作製するというプロジェクトを開始した。日本人に多い HLA-A2402 拘束性の TCR を使えば、1 種類で 60% の人に投与できる T 細胞製剤が作れる。候補 TCR 遺伝子の採取は、新型コロナの患者が多い藤田医科大学で行い、候補の TCR 遺伝子の絞り込みは京都大学で行う。臨床試験に向けた細胞の製造は藤田医科大学で行う。河本は 2020 年 12 月からクロスアポイントメントで藤田医科大学にも職位を得て研究室を持つことになった。

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. We have started a project in 2019 with the support by AMED, in which we develop a universal off-the-shelf T cells. In 2020, pandemic of COVID-19 took place. We decided to apply our strategy to COVID-19.

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. 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. 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.

2) Application of off-the-shelf T cell therapy to COVID-19

Whereas our group has mainly developed T cell medicine for cancer, it is possible to utilize regenerated T cells for viral infectious diseases. Meanwhile, SARS-CoV2 virus has emerged in 2019 and disease caused by this virus (COVID-19) has spread as pandemic in 2020. We then started a project in which TCR gene is cloned from recovered COVID-19 patients and produce anti-virus T cells by using TCR-iPSC method (Figure 1). When TCR restricted to HLA-A2402, which is the most frequent HLA molecule in Japanese, is used in this strategy, the regenerated T cells can cover 60% of Japanese people. To this aim, Kawamoto has obtained cross-appointment position in Fujita Health University, and has started to maintain a new laboratory there.

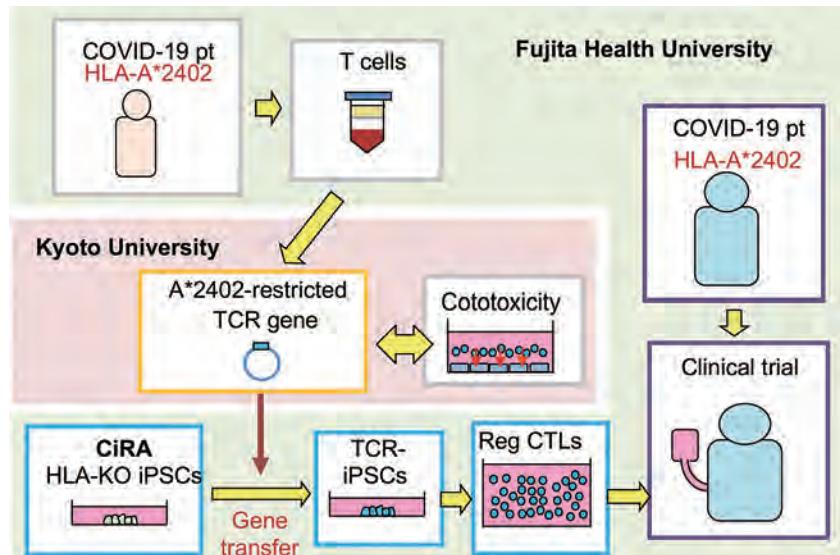


Figure 1 Development of off-the-shelf T cells to be used for the treatment of COVID-19

Candidate TCR genes, restricted to HLA-A2402, will be cloned in the laboratory in Fujita Health University, and then selection of the best one from these candidates will be done in the laboratory in Kyoto University. The selected TCR gene will be transferred to HLA-KO universal iPS cells, from which the regenerated T cells will be produced. Cell production for clinical trial will be conducted in Fujita Health University.

Candidate TCR genes will be cloned in Fujita laboratory, and then selection of the best one from these candidates will be done in Kyoto laboratory. Cell production for clinical trial will be conducted in Fujita Health University.

List of Publications

- Kashima, S., Maeda, T., Masuda, K., Nagano, S., Inoue, T., Takeda, M., Kono, Y., Kobayashi, T., Saito, S., Higuchi, T., Ichise, H., Kobayashi, Y., Iwaisako, K., Terada, K., Agata, Y., Numakura, K., Saito, M., Narita, S., Yasukawa, M., Ogawa, O., Habuchi, T., and Kawamoto, H. (2020). Cytotoxic T Lymphocytes Regenerated from iPS Cells Have Therapeutic Efficacy in a Patient-Derived Xenograft Solid Tumor Model. **iScience**. 23 (4): 100998.
- Nagasawa, M., Tomimatsu, K., Terada, K., Kondo, K., Miyazaki, K., Miyazaki, M., Motoooka, D., Okuzaki, D., Yoshida, T., Kageyama, S., Kawamoto, H., Kawauchi, A., and Agata, Y. (2020). Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer. **Biochem Biophys Res Commun**. 526 (1): 128-134.
- Miyazaki, K., Watanabe, H., Yoshikawa, G., Chen, K., Hidaka, R., Aitani, Y., Osawa, K., Takeda, R., Ochi, Y., Tani-ichi, S., Uehata, T., Takeuchi, O., Ikuta, K., Ogawa, S., Kondoh, G., Lin, CY., Ogata, H., and Miyazaki, M. (2020). Transcription factor E2A activates multiple enhancers that drive *Rag* expression in developing T and B cells. **Science Immunology**. 5 (51): eabb1455.
- Maeda, T., Nagano, S., Kashima, S., Terada, K., Agata, Y., Ichise, H., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Fujiki, F., Sugiyama, H., Kitawaki, T., Kadowaki, N., Takaori-Kondo, A., Masuda, K., and Kawamoto, H. (2020). Regeneration of Tumor-Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes from iPSCs Transduced with Exogenous TCR Genes. **Mol Ther Methods Clin Dev**. 19: 250-260.
- 嘉島相輝、増田喬子、河本宏 (2020). iPS 細胞から再生した T 細胞を用いたがん免疫療法の開発 – WT1 抗原を発現する固形がんを標的にして 医学のあゆみ 273 (5), 450-459
- 河本宏 (2020). 免疫応答の仕組み：自然免疫と獲得免疫の連携 医学のあゆみ 274 (3), 309-318
- 嘉島相輝、増田喬子、河本宏 (2020). 多能性幹細胞から再生キラー T 細胞を量産 固形がんへの応用 癌と化学療法 47 (10), 1415-1420
- 河本宏 (2020). 免疫学の歴史を俯瞰して現状と課題を考える 医学のあゆみ 275 (7), 833-841
- 河本宏 (2020). 細胞医薬の歴史 実験医学増刊 38 (17), 16 (2808) -24 (2816)
- 河本宏、増田喬子 (2020). iPS 細胞技術を用いた汎用性 T 細胞製剤の開発 実験医学増刊 38 (17), 155 (2947) -163 (2955)
- 河本宏 (2020). 免疫応答の基本的な仕組み 小児科臨床 73 (12), 1707 (83) -1715 (91)

List of Presentation

- Kawamoto, H. Development of “TCR cassette method”: a new method to transduce pluripotent stem cells with exogenous TCR gene. Eradicate Cancer 2020. Virtual Conference, December 15-16, 2020.
- Miyazaki, M. E2A specifies adaptive immunity by instructing large-scale topological changes for Rag gene super-enhancer formation. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Gene Expression & Signaling in the Immune System. Cold Spring Harbor, NY, USA (Virtual). October 14, 2020.
- 河本宏 がん免疫療法の現状と課題－即納型T細胞製剤の開発－ 第5回日本骨免疫学会 ウィンタースクール、軽井沢、2020年1月23-25日
- 河本宏 腫瘍免疫の基礎と臨床－即納型T細胞製剤の開発－ 第24回造血器腫瘍研究会、神戸、2020年1月31日-2月1日
- 河本宏 よくわかる免疫学：自然免疫編 第3回日本免疫不全・自己炎症学会、東京、2020年2月15日
- 河本宏 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的CTLの量産－即効型T細胞製剤の開発－ 第17回日本免疫治療学会学術集会、東京、2020年2月22日
- 河本宏 TCR遺伝子導入iPS細胞からCTLを再生するための新規の方法：TCRカセット法の開発 第12回日本血液疾患免疫療法学会学術集会、大阪・Web、2020年9月12日
- 河本宏 Conversion of T, B, erythroid and megakaryocyte progenitors to myeloid cells by inactivation of polycomb complex 第82回日本血液学会学術集会、京都（Web開催）、2020年10月10日-11月8日
- 河本宏 多能性幹細胞を材料とした汎用性即納型T細胞製剤の開発、第48回日本臨床免疫学会総会、Web開催、2020年10月15-17日
- Kawamoto, H. Regeneration of T cells using the iPS cell technology: Development of “off-the-shelf T cells” for cancer immunotherapy. 47th IMSUT Founding Commemorative Symposium “Neo-Immunology on infection, allergy and cancer”. Online, November 27, 2020.
- 永野誠治 Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method（ポスター） 新学術領域ネオセルフ「若手の会」、伊豆、2020年1月10-11日
- 小林由佳 The construction of functional human-type artificial lymphoid tissues in immunodeficient mice（ポスター） 新学術領域ネオセルフ「若手の会」、伊豆、2020年1月10-11日
- 長畠洋佑 諸系列の血液細胞におけるミエロイド分化能の共通した抑制機構 新学術領域ネオセルフ「若手の会」、伊豆、2020年1月10-11日
- 永野誠治 TCR遺伝子導入iPS細胞からCTLを再生するための新規の方法：TCRカセット法の開

発 第24回日本がん免疫学会総会、札幌・Web、2020年10月7-9日

長畠洋佑 ポリコム欠失による諸系列の血液細胞からミエロイド細胞への進化的初期化 第82回
日本血液学会学術集会、京都（Web開催）、2020年10月10日-11月8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）
Laboratory of Immunology

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

共焦点顕微鏡を用いると蛍光ラベルされた細胞やオルガネラ、集積する分子の局在やそれらの動きを立体的に観察することができ、マルチフォトン顕微鏡を用いれば、さらに組織の深部の様子までクリアに観察することができる。生きたゼブラフィッシュやマウスを用いて、臓器形成過程、あるいは再生過程を捉えようとする我々にとって、後者はとても魅力的な顕微鏡システムである。しかし、発生・再生過程を知るには、実はかなり長期に渡って撮像する必要があり、そうなると、固定サンプルの観察時には気づかない、様々な問題が浮上する。今回は、生きたマウスを用いて骨格筋再生における幹細胞の動きを捉えようとしていた曾我部舞奈（研究員・医博）が、それらの問題解決に挑む中、sparse modeling に着目し、それを用いた技術開発に成功したので、報告したい。詳しくは次の論文を参照していただきたい。Sogabe M., et al., *J Biophotonics* (2020) (<https://doi.org/10.1002/jbio.201960204>)

生命の「動き」を計測するためには、精細な映像を取得する必要があるが、それを阻むのが、計測機器ノイズや撮像対象が生み出すアーティファクトである。そのなかでも今回は、制御できない微細な動きの影響を受けにくいイメージングを可能にする研究について紹介する。

ここでいう制御できない動きというのは呼吸や心拍といった生命維持に必要な微細な動きのことである。走っている馬を撮影すると精細な馬の輪郭像が得られないのと同じように、目視下で微細な動きではあっても顕微鏡下においては、映像の大きなぼやけやノイズを生み出し、生体内の組織動態情報を鮮明に得ることを邪魔してしまう。これを防ぐた

めには、高速に撮像をする必要があるが、高速に撮像することを優先するとどうしても空間解像度か、時間解像度か、というトレードオフに直面する（図2）。

そこで本研究では、撮像を間引



図1 計測精度に影響を与えるファクター

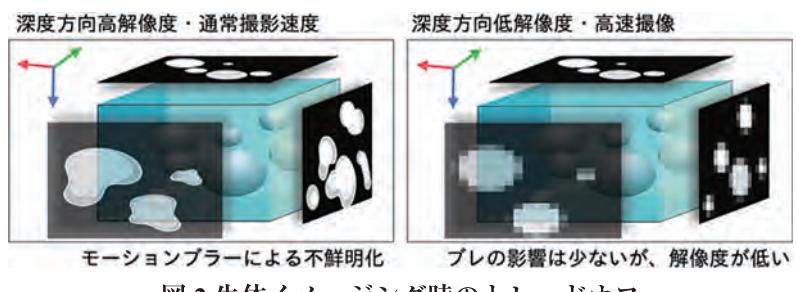


図2 生体イメージング時のトレードオフ

くこと（インターレース撮像）により、スキャンスピードを高め、「ボケ」の少ない映像を取得すると共に、削減された情報を顕微鏡画像特有のスパースな構造を事前情報として導入することで正確に補間する立体情報復元アルゴリズムの開発を目指した。ここでいう顕微鏡画像の持つスパース性というのは、計測される蛍光シグナルは画像全体にあるのではなく、一部の例外を除いてある程度限局して取得され、その結果ほとんどの画像中の輝度値がゼロ（＝黒）になることを示す。こういったいくつかの前提を用いると、間引き撮像をした場合においても、その間の情報を埋めることができるようになる。

本研究の手法を用いると、例えば筋再生中の筋幹細胞や血管組織等の動態変化が緩慢な組織を用いて、従来の詳細撮像およびインターレース撮像を行なった場合、そして開発手法を用いた場合の復元画像の評価を行った。その結果、画像の視認性の指標となるIQスコアは従来法と比較して、開発手法で57%増加した。そのほかにも、角膜や末梢神経等でも開発手法は従来法に比べ有意な画質改善が可能であることが示唆された。

急速な動態変化を示す生命現象下での本技術の有用性を評価するため、血管内イメージングも実施した。その結果130μm厚の組織動態を捉えるイメージングを行うと、従来法では血流速度に比べスキャン速度が遅いため、血球細胞情報を得ることができなかつたが、インターレース撮像と立体情報復元技術を用いることで、一細胞を描出することが可能になった（図3）。

正常組織の描出能力だけではなく、病態時の場合における描出能力を評価するため、マウスを用いて血栓の計測を行った。その結果、血管壁の損傷と、血管内での塞栓形成、および再灌流過程を捉えることに成功した（図4）。

このように、生物画像持つ特異的な画像構造という特徴を用いることで、より実用性の高いイ

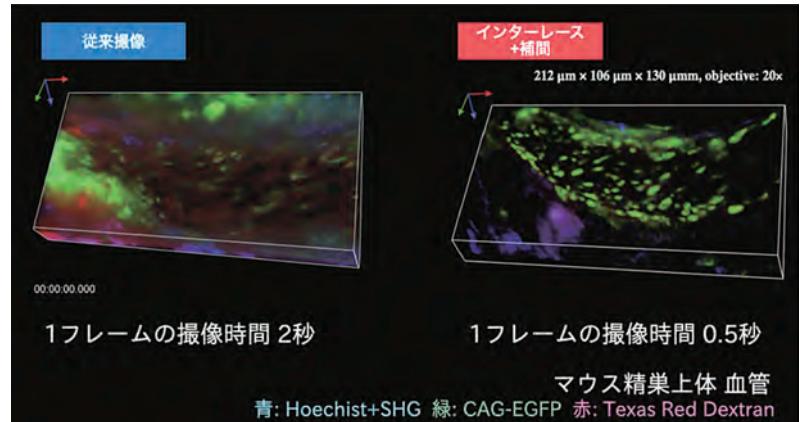


図3 開発手法を用いた血管イメージングの像

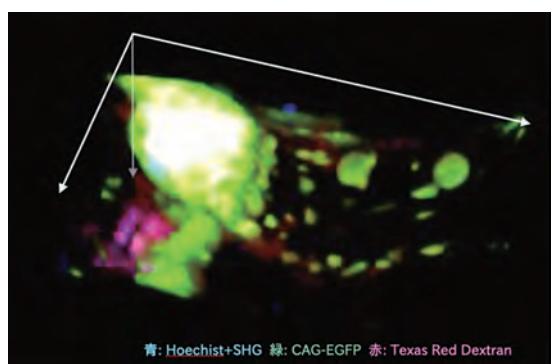
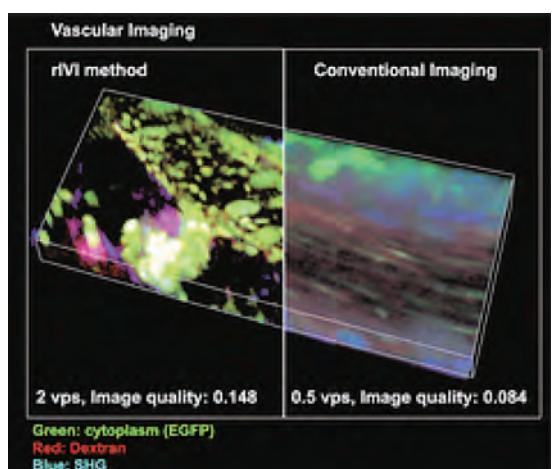


図4 血管内で血栓が形成される様子



メーリングを実現できた。今後は、これらの技術により、高速で動く物体やダイナミックな細胞動態を捉えることが可能になり、これまで組織の特性によって制限されてきた生体内ライブイメージングの応用可能性が広がり、正常組織の動態や、病態の解明につながることが期待される。

List of Publications

- Kuriki M, Sato F, Arai H, Sogabe M, Kaneko M, Kiyonari H, Kawakami K, Yoshimoto Y, Shukunami C, and Sehara-Fujisawa A. (2020). Transient and lineage-restricted requirement of Ebf3 for sternum ossification. **Development** 147, dev186239.
- Sogabe M, Ohzeki M, Fujimoto K, Sehara-Fujisawa A and Nishimura S. (2020). Restored interlaced volumetric imaging increases image quality and scanning speed during intravital imaging in living mice. **J Biophotonics** 13, e201960204
- Zhu Y, Cui G, Miyauchi E, Nakanishi Y, Mukohira H, Shimba A, Abe S, Tani-Ichi S, Hara T, Nakase H, Chiba T, Sehara-Fujisawa A, Seno H, Ohno H, Ikuta K. (2020) Intestinal epithelial cell-derived IL-15 determines local maintenance and maturation of intra-epithelial lymphocytes in the intestine. **Int Immunol.** 32, 307-319.
- Nakamura Y, Kita S, Tanaka Y, Fukuda S, Obata Y, Okita T, Kawachi Y, Tsugawa-Shimizu Y, Fujishima Y, Nishizawa H, Miyagawa S, Sawa Y, Sehara-Fujisawa A, Maeda N, Shimomura I. (2020) A disintegrin and metalloprotease 12 prevents heart failure by regulating hypertrophy and fibrosis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 318, H238-H251.
- Iida A, Wang Z, Hondo E, Sehara-Fujisawa A. (2020). Generation and evaluation of a transgenic zebrafish for tissue-specific expression of a dominant-negative Rho-associated protein kinase-2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 525, 8-13.

List of Presentations

- 瀬原淳子「骨格筋の抗重力について考える」第43回日本分子生物学会 フォーラム「骨格筋細胞研究がリードする新しい健康科学の分子生物学新機軸」、オンライン開催、2020年12月2-4日
- 曾我部舞奈「血流動態と細胞形態の同時解析を実現する生体マウス最適化ライブイメージング」第63回日本神経科学大会、東京、2020年9月10-12日
- 佐藤文規、瀬原淳子「骨格筋の重力／無重力応答に関する研究」第59回生体医工学会大会 シンポジウム「宇宙に生き、地上で活かす」、オンライン開催、2020年5月26日
- 曾我部舞奈「生体ライブイメージングにおける最適なデータ取得のための技術革新」JST ACT-I情報と未来 先端研究フォーラム、オンライン開催、2020年5月15-16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 Project Assoc. 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) ゲノミックエンハンサーの生理機能解析、に取り組んでいる。

(1) がんに随伴する宿主の病態生理に関する研究

がん医療の発展はめざましいが、がんによる死者の数は依然として多い。2019年、我が国では、約38万人ががんで亡くなった。全死亡者数の25%に相当する数である。

がんを根治できない場合、がんによって生じる個体の不調を抑制することが重要となる。がんに起因する不調が生じると、患者の Quality of Life (QOL) が低下する。抗がん剤治療などの効果も得にくくなる。最終的には、患者の生命が脅かされることになる。

現時点では、がんに起因する個体の不調を強力に抑制する方法は存在しない。がんによって個体に生じる不調が多臓器・多因子性の複雑な病態のあつまりであり、その全貌を捉えきれないことが一因であると考えられる。

本研究グループでは、がんに起因する宿主の不調の全体像を捉え、そのメカニズムを理解することを目指している。この目的を達成するために、がんを持つ個体の宿主臓器で起こる変容を多階層レベルで記載し、記載したそれぞれの変容に重要な宿主側の要因を見つける、という戦略をもちいてきた。成果の一例として、最近、後腸のがんが肝臓のコレステロール代謝遺伝子 *cyp7a1* 遺伝子に作用することで代謝を搅乱し、肝臓に炎症を引き起こすことを見出した (*Dis. Model. Mech.*, 2018)。乳がんが肝臓の概日リズムを搅乱し、肝臓に種々の異常を引き起こすこともわかった (*Oncotarget*, 2017)。本年度は、この戦略に基づく研究をさらに発展させ、がんに起因する不調に関わる新しい因子を複数同定した。さらに、これらの因子ががんに起因する不調のどの部分にどのように関わっているのかを、多階層オミクスによって明らかにした。

(2) ゲノミックエンハンサーの生理機能解析

本研究では、エンハンサーの機能解析をとおして、特定の遺伝子に対する遺伝子発現制御がもつ生理的意義を明らかにしようとしている。エンハンサーとは、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、エンハンサーの生理機能解析は、ゲノム科学分野において推進すべき重要な課題の一つであると考えている。本研究グループでは、

胸腺細胞の発生に重要なエンハンサーを発見し、胸腺細胞がどのように自己と非自己を見分けているのかを明らかにした (*Nat. Commun.*, 2019)。2020年度もエンハンサー遺伝学を活用した研究を推進し、概日リズムの創出に関わる新規なエンハンサーを発見、個体におけるその生理的な意義を解明した。

Our group studies (1) the mechanisms underlying host pathophysiology caused by cancers and (2) physiological roles of enhancers *in vivo* with the aid of enhancer genetics.

(1) Host pathophysiology in cancers

Despite advances in cancer biology, the number of cancer-induced death is still large. In 2019 in Japan, approximately 380,000 people died due to incurable cancers. Cancer-induced deaths account for 25% of total deaths in our country.

When cancers are incurable, it is critical to suppress cancer's adverse effects on the host. Cancers severely compromise therapeutic efficacy, deteriorate quality of life, and decrease survival in cancer patients.

Yet, it is currently impossible to effectively ameliorate host pathophysiology in cancers. This is attributed to our incomplete understanding of the mechanisms behind host pathophysiology. Host pathophysiology in cancers is a collection of multi-organ and multi-factorial abnormalities in various host organs. It has thus been challenging to understand the entire picture of such a complex syndrome.

We aim to reveal the mechanisms of host pathophysiology in cancers at the organismal level. We describe the nature of host pathophysiology in cancers using multi-omics and seek host factors involved in each abnormality with mouse genetics. With the aid of this approach, we already found that gut tumor tunes hepatic expression of a cholesterol-metabolizing gene *cyp7a1* to exacerbate liver inflammation (*Dis. Model. Mech.*, 2018). We also found that breast cancer rewrites liver circadian transcriptome and causes various problems in the liver (*Oncotarget*, 2017). In this fiscal year, we extended the above-described study and identified a couple of novel host factors that contribute to host pathophysiology. Moreover, we dissected how these new factors are involved in host pathophysiology using multi-omics. We aim to depict the entire picture of complex host pathophysiology caused by cancers and to develop novel therapeutics to ameliorate cancer's adverse effects on the host.

(2) Revealing physiological roles of enhancers *in vivo*

Our group aims to reveal the physiological roles of enhancers *in vivo* via genetic deletion of enhancers, enhancer genetics. Enhancers are non-coding DNA elements that determine when, where, and how much a target gene is expressed. Mouse and human genomes encode more than 100,000 active enhancers. Yet, our knowledge on how these enhancers contribute to organismal physiology is limited: the number of enhancers whose *in vivo* function is known is estimated to only 0.3%. Unraveling *in vivo* roles of enhancers is one of the next important challenges in genome biology. Our group recently identified a genomic enhancer that

enforces proper apoptosis induction in thymic negative selection, eliminating potentially disease-causing T cells (*Nat. Commun.*, 2019). In this fiscal year, we found other physiologically important enhancers, one of which contributes to the establishment of circadian rhythm of a particular gene in vivo.

List of Publications

小西理予、河岡慎平 (2020). エンハンサーを利用した細胞の制御 実験医学 38, 17:100-106.

北條広朗、水野林、河岡慎平 (2020). マルチオミクスを活用したがん悪液質の理解 実験医学 38, 8:1300-1305.

List of Presentations

Mizuno, R., Konishi, R., and Kawaoka, S. Multi-omics and genetic analyses on pathophysiology of host organs in cancer-bearing animals. Cancer Cachexia Conference 2020, virtual, September 10-11, 2020.

Kawaoka, S. Enhancer genetics reveals physiological significance of expression rhythm of a single gene. Society for Research on Biological Rhythms 2020, virtual, June 1-3, 2020.

Kawaoka, S. Host pathophysiology in cancers: from local to systemic. The 9th Smart-Aging Symposium, virtual hosted by Tohoku University, December 16, 2020.

Kawaoka, S. Dissecting physiological significance of expression rhythm of a single gene via enhancer genetics. The 43th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, held online, December 3, 2020.

河岡慎平 がんに起因する宿主の病態生理に関する研究 . 第 38 回 日本肥満症治療学会学術集会、バーチャル開催、2020 年 3 月 20 日

河岡慎平 エンハンサー遺伝学とマルチオミクス解析による生命現象の理解 . 第 93 回日本生化学会、バーチャル開催、2020 年 9 月 16 日

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 . 慶應大学医学部 微生物学・免疫学教室セミナー、東京、2020 年 2 月 19 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 紹介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。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いることを確認している。現在、コラーゲンゲルを足場とした誘導実験に単一細胞 RNA シークエンス解析を併用することで、その過程の詳細な段階を明かにして、細胞分化を決定する因子の同定を目指している。

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、そこから更にトリヨードサイロニン (T3) を添加することで肥大軟骨細胞まで誘導することに成功した（図 1）。この誘導法は、成長板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、成長軟骨板の異常が原因である疾患の病態解明から創薬スクリーニングの

プラットフォームとしても有用なものであると考えている。

3) 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。

また理化学研究所生命科学研究センターの戎家美紀博士（現 EMBL バルセロナ）、京都大学 iPS 細胞研究所 Cantas Alev 博士（現京都大学高等研究院）との共同研究により、脊椎肋骨異骨症 (Spondylocostal dysostosis, SCD) 患者由来の iPS 細胞を用いて、脊椎肋骨の形成異常の原因であると想定されている体節時計の異常を *in vitro* で再現することに成功した（図 2）。

これらの疾患に加えて平成 29 年 9 月から開始された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、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

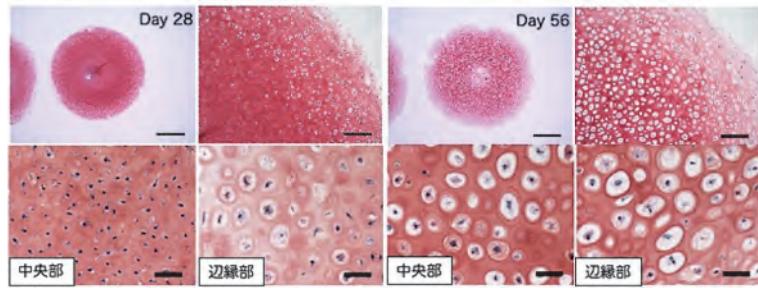


図 1. iPS 細胞から硬節まで誘導し、その後に軟骨分化誘導を開始して 14 日目より T3 を添加した。その結果 28 日目には形成された細胞塊の辺縁部が、56 日目には全体に肥大軟骨細胞が誘導された。

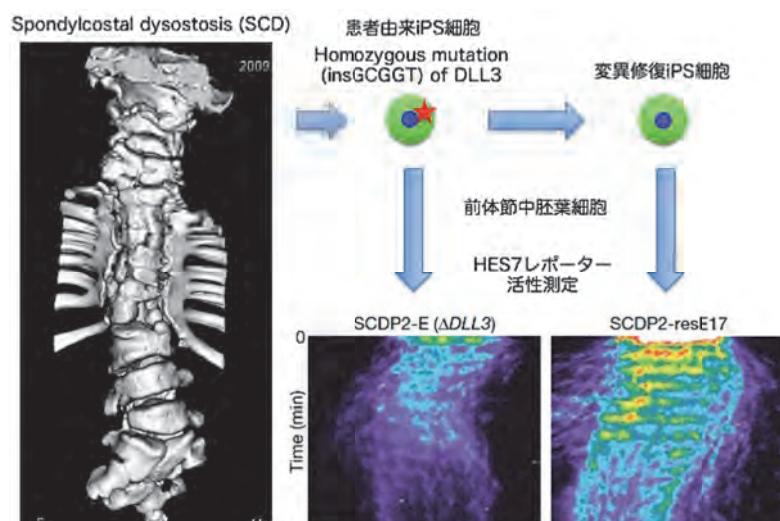


図 2. 両 DLL3 遺伝子に変異（5 塩基挿入）を有する重症の SCD 患者より、iPS 細胞を樹立。それぞれに HES7 遺伝子のレポーターを導入した後に、前体節中胚葉細胞まで誘導し、HES7 遺伝子の発現振動を解析した。その結果、変異細胞では変異修復細胞で観察された規則的な発現振動が消失していることが判明した。

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, Kyoto University, and confirmed the differentiation process using immunocytochemical staining. Currently by the combination with the culture system using type I collagen gel and the single cell RNA sequencing analyses, we are investing the precise process of differentiation and searching the fate-decision factor.

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 using triiodothyronine (T3) (Figure 1). This induction method will be a useful tool to analyze the molecular process in the growth plate, and also serve as a platform to understand the pathology

and develop therapeutic drugs for 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.

By the collaboration with Dr. Miki Ebisuya (currently in EMBL Barcelona) in RIKEN, Kobe, and Dr. Cantas Alev (currently in ASHBi of Kyoto University) in CiRA, Kyoto University, we have succeeded to recapitulate the abnormal oscillation of clock gene using iPS cells derived from patients with spondylocostal dysostosis (SCD) (Figure 2).

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

- Matsuda M, Hayashi H, Garcia-Ojalvo J, Yoshioka-Kobayashi K, Kageyama R, Yamanaka Y, Ikeya M, Toguchida J, Alev C, Ebisuya M. (2020). Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds. *Science* 369, 1450-5.
- Yamashita A, Yoshitomi H, Kihara S, Toguchida J, Tsumaki N. (2021). Culture substrate-associated YAP inactivation underlies chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 10, 115-27. Epub 2020 Aug 21.

Nishida Y, Hamada S, Kawai A, Kunisada T, Ogose A, Matsumoto Y, Ae K, Toguchida J, Ozaki T, Hirakawa A, Motoi T, Sakai T, Kobayashi E, Gokita T, Okamoto T, Matsunobu T, Shimizu K, Koike H. (2020). Risk factors of local recurrence after surgery in extraabdominal desmoid-type fibromatosis: A multicenter study in Japan. *Cancer Sci.* 111, 2935-42.

Maekawa H, Kawai S, Nishio M, Nagata S, Jin Y, Yoshitomi H, Matsuda S, Toguchida J. (2020). Prophylactic treatment of rapamycin ameliorates naturally developing and episode -induced heterotopic ossification in mice expressing human mutant ACVR1. *Orphanet J Rare Dis.* 15, 122.

Matsuda M, Yamanaka Y, Uemura M, Osawa M, Saito MK, Nagahashi A, Nishio M, Guo L, Ikegawa S, Sakurai S, Kihara S, Maurissen TL, Nakamura M, Matsumoto T, Yoshitomi H, Ikeya M, Kawakami N, Yamamoto T, Woltjen K, Ebisuya M, Toguchida J, Alev C. (2020). Recapitulating the human segmentation clock with pluripotent stem cells. *Nature* 580, 124-9.

Toguchida J. Application of iPS Cell Technology for OPLL. In OPLL Ossification of the posterior longitudinal ligament 3rd Edition, p.65-73. Okawa A, Matsumoto M, Iwasaki M, Kawaguchi Y eds. Springer Nature Singapore 2020.

戸口田淳也 (2020). 肉腫基礎研究の歴史と展望 肉腫 - 基礎・臨床の最新治験 – 日本臨床 78 (増刊号 5), 10-15.

戸口田淳也 (2020). 骨格系統疾患の病態解明から創薬 医学のあゆみ 274, 373-8.

戸口田淳也 (2020). iPS 細胞を活用した骨・軟骨疾患の病態解明と創薬 **BIO CLINICA** 35, 30-35

戸口田淳也 (2020). 革新的技術がもたらす小児運動器難病の新展開 基礎から臨床へ 小児整形外科研究の進歩 整形外科 71, 1108-9.

川井俊介、戸口田淳也 (2020). 革新的技術がもたらす小児運動器難病の新展開 基礎から臨床へ 骨形成不全症 – iPS 細胞を活用して 整形外科 271, 1303-8.

List of Presentations

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した骨形成機構の解析 第 5 回日本骨免疫学会ウインタースクール、軽井沢、2020 年 1 月 3 日

戸口田淳也 iPS 細胞の医療応用：現状と展望 とっとり経済交流セミナー in 関西、大阪、2020 年 2 月 5 日

川井俊介、須長純子、永田早苗、西尾恵、安達泰治、松田秀一、戸口田淳也 ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 骨形成過程モデルの構築とその解析 第 19 回日本再生医療学会、横浜（オンライン）、2020 年 3 月 13 日

樋本玲菜、川井俊介、戸口田淳也、患者由来 iPS 細胞を用いた後縦靭帯骨化症の病態解析 第 19 回日本再生医療学会、横浜（オンライン）、2020 年 3 月 13 日

Yann Pretemer、川井俊介、永田早苗、西尾恵、戸口田淳也 iPS 細胞由来肥大軟骨細胞による遺伝性軟骨疾患の病態再現 第 19 回日本再生医療学会、横浜（オンライン）、2020 年 3 月 13 日

岡本健、野口貴志、坂本昭夫、松田秀一、戸口田淳也 脱分化型軟骨肉腫の臨床像と治療成績 第 53 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、札幌（オンライン）、2020 年 9 月 11 日

野口貴志、岡本健、坂本昭夫、戸口田淳也、松田秀一 骨巨細胞腫に対する術前デノスマブ投与の短期成績 第 53 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、札幌（オンライン）、2020 年 9 月 11 日

Maekawa H, Kawai S, Nshio M, Nagata S, Jin Y, Yoshitomi H, Matsuda S, Toguchida J Prophylactic treatment of rapamycin ameliorates naturally developing and episode-induced heterotopic ossification in mice expressing human mutant ACBVR1 ASBMR2020、シアトル（オンライン）、2020 年 9 月 12 日

Toguchida J Using iPSC for understanding skeletal diseases ASBMR 2020、シアトル（オンライン）、2020 年 9 月 13 日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した骨格系疾患の病態解析 産業医科大学第一内科大学院講義、北九州、2020 年 9 月 17 日

鎌倉武史、金永輝、玉置さくら、渡辺真、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也 変異型 IDH1 は通常酸素下において癌遺伝子誘導性細胞老化を引き起こす 第 79 回日本癌学会総会、広島（オンライン）、2020 年 10 月 2 日

Tamaki S, Nagata S, Jin Y, Yoshitomi H, Toguchida J Application of pluripotent stem cells for in vitro sarcomagenesis 第 79 回日本癌学会総会（オンライン）、広島、2020 年 10 月 2 日

戸口田淳也、金永輝、川井俊介、前川裕継 骨再生機構へのアプローチとしての異所性骨化の解析 第 38 回日本骨代謝学会、神戸（オンライン）、2020 年 10 月 11 日

川井俊介、須長純子、松田秀一、安達泰治、戸口田淳也 ヒト iPS 細胞による in vitro 骨形成過程再現系の構築とその解析 第 38 回日本骨代謝学会、神戸（オンライン）、2020 年 10 月 11 日

河村真吾、伊藤謙治、大野貴敏、清水克時、Knut Woltjen、小沢学、戸口田淳也、山本拓也、秋山治彦、山田泰広 EWS/ATF1 融合遺伝子は細胞種特異的エンハンサーに結合して明細胞肉腫を発生させる 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会、東京（オンライン）、2020 年 10 月 15 日

Toguchida J Investigation of Rare Diseases using Patient Derived iPS Cells India-Japan Webinar on Rare Genetic Disorders、オンライン、2020 年 10 月 16 日

戸口田淳也、金永輝、孫麗萍、川井俊介、前川裕継 異所性骨化のメカニズムとその制御 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会、東京（オンライン）、2020 年 10 月 16 日

川井俊介、永田早苗、西尾恵、樋本玲菜、松田秀一、戸口田淳也 同胞発生患者由来 iPS 細胞を用いた OPLL の遺伝的要因の探索 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会、東京（オンライン）、

2020 年 10 月 16 日

前川裕継、川井俊介、金永輝、西尾恵、永田早苗、古庄知己、道上敏美、池川志郎、松田秀一、戸口田淳也 患者由来 iPS 細胞を用いた Camurati-Engelmann 病の病態解析 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会（オンライン）、東京、2020 年 10 月 16 日

鎌倉武史、金永輝、玉置さくら、渡辺真、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也 変異型 IDH1 は通常酸素下において癌遺伝子誘導性細胞老化を引き起こす 第 43 回日本分子生物学会、オンライン、2020 年 12 月 4 日

孫麗萍、金永輝、鎌倉武史、玉置さくら、戸口田淳也 進行性骨化性線維異形成症におけるミトコンドリアのエネルギー代謝を標的とした新規治療法の検討 第 43 回日本分子生物学会、オンライン、2020 年 12 月 4 日

金永輝、吉富啓之、西尾恵、鎌倉武史、玉置さくら、孫麗萍、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 43 回日本分子生物学会、オンライン、2020 年 12 月 4 日

川井俊介、馬環純、戸口田淳也 iPS 細胞からの骨分化誘導系の確立と疾患解析への応用（骨形成不全症）第 6 回日本筋学会学術集会、名古屋（オンライン）、2020 年 12 月 20 日

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

准教授 角 昭一郎 Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

【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るとなる。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. Editorial: Regenerative Medicine in Diabetes. *Biomedicines* 8, 537, 2020. doi: 10.3390/biomedicines8120537

Yang SY, Yang KC, Sumi S. Prevascularization-free Primary Subcutaneous Transplantation of Xenogeneic Islets Coencapsulated With Hepatocyte Growth Factor. *Transplant Direct.* 6 (11): e620, 2020. doi: 10.1097/TXD.0000000000001078.

List of Presentations

Novel pre-vascularization free HGF containing macro-encapsulated device for xenogeneic islet subcutaneous transplantation. 23rd Annual Meeting of Japanese Society for Xenotransplantation, February, 2021, Kyoto, Japan (Online)

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

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

【多田グループ】

本グループでは、ヒト体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化される分子機構の解明を行っています。2016年には、体細胞と多能性幹細胞の中間段階である iRS (intermediately Reprogrammed Stem) 細胞株の樹立に成功し、再現性良く、高効率に、繰り返し iRS 細胞から iPS (人工多能性幹; induced Pluripotent Stem) 細胞に再プログラム化する姿を観察できる様になりました。iRS 細胞は、ゲノム編集等の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ともに内在性 *OCT4* 遺伝子が活性化、2) 内在性 *OCT4* 遺伝子活性の後に MET (Mesenchymal-Epithelial Transition) が起こる、3) MET 直後の *OCT4* の活性は不安定で、その後安定化することが明らかになった。iRS 細胞でのゲノム編集は、再プログラム化の分子機構解明に新たな展開をもたらすと期待される。

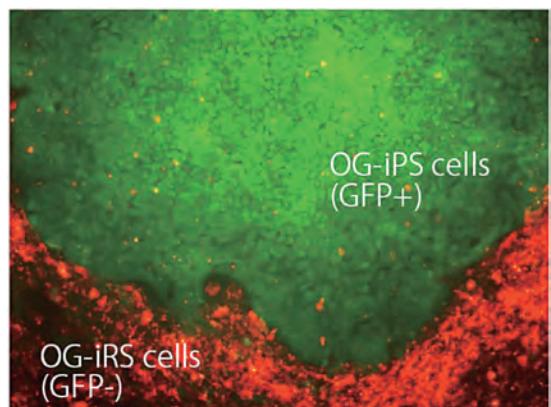


Fig.1. A GFP-positive iPS cell colony converted from OG-iRS cell

2) ヒト ADIPONECTIN と再生

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。

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.

【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。

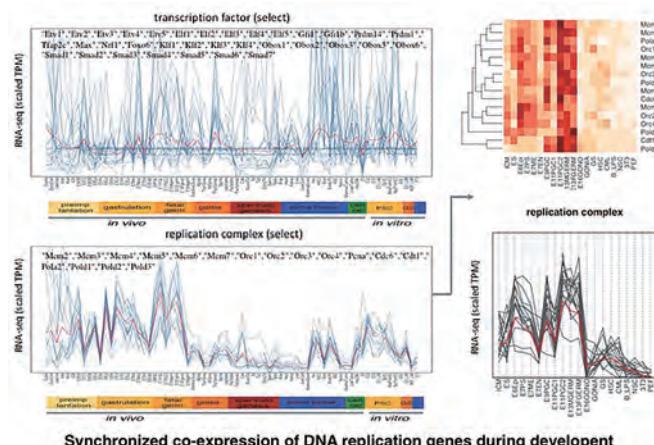
The genome integrity of pluripotent stem cells, which give rise to all the cell lineages including the germline, is of fundamental importance to both basic biology as well as biomedical application. However, it remains largely unclear whether and how the genetic stability of pluripotent stem cells and 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

Anand, D., Al Saai, S., Shrestha, S.K., Barnum, C.E., Chuma, S., and Lachke, S.A. (2021).

Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed miRNAs and Their Associated Regulatory Networks in Lenses Deficient for the Congenital Cataract-Linked Tudor Domain Containing Protein TDRD7. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 615761.

Barnum, C.E., Al Saai, S., Patel, S.D., Cheng, C., Anand, D., Xu, X., Dash, S., Siddam,



A.D., Glazewski, L., Paglione, E., et al. (2020). The Tudor-domain protein TDRD7, mutated in congenital cataract, controls the heat shock protein HSPB1 (HSP27) and lens fiber cell morphology. *Hum. Mol. Genet.* 29, 2076–2097.

Ichimura, H., Kadota, S., Kashihara, T., Yamada, M., Ito, K., Kobayashi, H., Tanaka, Y., Shiba, N., Chuma, S., Tohyama, S., et al. (2020). Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes *in vivo*. *Sci. Rep.* 10.

Ishiguro, K. ichiro, Matsuura, K., Tani, N., Takeda, N., Usuki, S., Yamane, M., Sugimoto, M., Fujimura, S., Hosokawa, M., Chuma, S., et al. (2020). MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells. *Dev. Cell* 52, 429-445.e10.

Yamauchi, K., Ikeda, T., Hosokawa, M., Nakatsuji, N., Kawase, E., Chuma, S., Hasegawa, K., and Suemori, H. (2020). Overexpression of Nuclear Receptor 5A1 Induces and Maintains an Intermediate State of Conversion between Primed and Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports* 14, 506–519.

List of Presentation

Shinchiro Chuma. Meiosis priming program and genome stability control of the germline stem cell cycle in mouse development. MBSJ2000. ZOOM. 2020.12.04

中馬新一郎 . 初期発生軸に沿った幹細胞の増殖分化プログラムと遺伝的安定性の可塑性 .

新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」「全能性プログラム」合同公開シンポジウム .
ZOOM. 2020.12.23

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

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

当分野では、不妊症、免疫関連疾患の新規治療法開発を目指し、受精と自己免疫寛容維持の新規メカニズムの解明に焦点をあてた研究を展開している。本年度は、マウス精子が受精能を獲得する過程において重要な役割を担う新規 GPI アンカー型タンパク質の同定を試みた。一方、肝線維化マウスモデルを用いて、炎症組織内の制御性 T 細胞が肝障害および線維化を促進する特異的な細胞性炎症応答を抑制することにより病理的変化を抑えることを見いだした。これらの鍵となる細胞および因子を標的とした免疫学的制御法の開発に進むことで、肝炎症、線維化を制御するための新規治療法の確立が期待できる。

1) マウス精子受精能に重要な新規 GPI アンカー型タンパク質の同定

マウス精子は、段階的な成熟過程を経ることで受精能を獲得することが知られている。我々は、先行研究において受精能獲得過程にある精子の膜表面では GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) 遊離とラフト局在変化が運動して起こり、前年度において精子受精能とラフト局在変化との間に正の相関性を見出した。そこで、今年度は、精子受精能に重要な新規 GPI-AP の同定をするため、網羅的プロテオミクスの手法を用いて精巣をはじめとする様々組織における GPI-AP の発現を概観し、その中から機能的に重要とおもわれる分子を抽出した。さらにそれらのいくつかの遺伝子ノックアウトマウスを Crispr-Cas9 ゲノム編集法で作製し、生殖能を調べたところ、オスの生殖異常を示すものが複数同定された。

2) 免疫寛容維持機構と T ヘルパー細胞の制御機構

生体の恒常性を維持するため、免疫システムの鍵となる免疫寛容維持機構が常時作動し、自己反応性 T ヘルパー細胞の活性化を積極的に制御している。免疫寛容維持機構の破綻により、免疫細胞による自己組織・臓器の傷害、損傷が起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、薬剤誘導性の肝炎症・線維化モデルを用いて、Foxp3+ 制御性 T 細胞が肝臓病理を促進するエフェクター細胞の機能を抑制することを見いだし、肝臓の慢性炎症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。

Foxp3+ 制御性 T 細胞は免疫寛容および組織恒常性維持を司る獲得免疫系の細胞サブセットであ

るが、これまで肝臓組織内の制御性T細胞がどのように肝線維化に至る肝障害および慢性炎症を制御するのか不明な点が多くかった。

私たちは、carbon tetrachloride (CCl_4) 投与による薬剤性肝障害モデルを用い、制御性T細胞による肝臓の慢性炎症、線維化制御機構の解析をおこなった。 CCl_4 投与による慢性肝障害によって肝臓組織内の制御性T細胞は増殖し、炎症環境下における肝線維化を抑える組織修復機能の関与が示唆された。 CCl_4 投与に続き制御性T細胞を実験的に除去することで、線維化を含めた肝臓病理所見が増悪化した。この時、IL-4産生Tヘルパー細胞および $CCR2^{high}$ $Ly-6C^{high}$ 炎症性単球が活性化、増殖することで肝線維化を促進することが示唆された。制御性T細胞は組織炎症に反応してAmphiregulin (Areg) を産生することで組織リモデリング・修復を促進することが報告されているが、 CCl_4 誘導性肝障害モデルにおいて制御性T細胞特異的なAregは肝組織の炎症遺伝子プロファイル変化には関与しなかった。

これらの結果から、肝臓の慢性炎症に対する新規治療戦略として制御性T細胞の細胞性炎症応答制御に特異的な機能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 2020, we attempted to identify novel GPI-anchored proteins that play important roles in the process by which mouse sperm acquire fertility. Moreover, we elucidated a critical role of hepatic regulatory T cells in preventing liver pathology by suppressing inflammatory cellular immunity that can promote liver damage and fibrosis. Harnessing Treg functions, which effectively regulate tissue cellular immunity, may be a therapeutic strategy for preventing and treating liver pathology.

1) Identification of novel GPI-anchored proteins important for mouse sperm fertility

Mouse sperm are known to acquire fertility through a gradual maturation process. In previous studies, GPI-anchored protein (GPI-AP) release and raft localization change occurred in sperm membrane during the fertility acquisition process, and we found a positive correlation between sperm fertility and raft localization change, previously. Therefore, in order to identify new GPI-AP that is important for sperm fertilization ability, we used a comprehensive proteomics analysis to overview the expression of GPI-AP in various tissues including the testis, and molecules that are considered to be functionally important were selected. Then, gene knockout mice were developed by the Crispr-Cas9 method and some of them showed male reproductive abnormalities.

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.

Using carbon tetrachloride (CCl₄) -induced liver fibrosis model, we found that hepatic Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells play a critical role in preventing liver pathology by suppressing inflammatory cellular immunity that can promote liver damage and fibrosis.

Treg cells are pivotal in maintaining immunological self-tolerance and tissue homeostasis; however, it remains unclear how tissue Treg cells respond to liver injury and regulate chronic inflammation, which can cause liver fibrosis.

Chronic liver inflammation induced by injections of CCl₄ led to preferential expansion of hepatic Treg cells that prevented liver fibrosis. In contrast, depletion of Treg cells in the CCl₄-induced liver fibrosis model exacerbated the severity of liver pathology. Treg depletion unleashed tissue cellular immunity and drove the activation and expansion of the pro-fibrotic IL-4-producing T helper 2 cells, as well as CCR2^{high} Ly-6C^{high} inflammatory monocytes in the inflamed liver. Although Treg expression of amphiregulin plays a key role in tissue remodeling and repair in various inflammation models, amphiregulin from hepatic Treg cells was dispensable for maintaining liver homeostasis and preventing liver fibrosis during CCl₄-induced chronic inflammation.

Our results indicate that Treg cells control chronic liver inflammation and fibrosis by regulating the aberrant activation and functions of immune effector cells.

List of Publications

- Takeuchi Y, **Hirota K**, Sakaguchi S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis. *Immunol Rev.* 294 (1):164-176 (2020).
- Ikeno Y, Ohara D, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Taura K, Uemoto S, **Hirota K**. Foxp3⁺ Regulatory T Cells Inhibit CCl₄-Induced Liver Inflammation and Fibrosis by Regulating Tissue Cellular Immunity. *Front Immunol.* 15;11:584048 (2020).
- Das N.R., Miyata H., Hara H., Chida J., Uchiyama K., Masujin K., **Watanabe H.**, **Kondoh G.**, and Sakaguchi S. The N-Terminal Polybasic Region of Prion Protein Is Crucial in Prion Pathogenesis Independently of the Octapeptide Repeat Region. *Mol Neurobiol.* Feb;57 (2):1203-1216 (2020).
- Nakao, S., Takeo, T., **Watanabe, H.**, **Kondoh, G.**, Nakagata, N. Successful selection of mouse sperm with high viability and fertility using microfluidics chip cell sorter. *Scientific Reports*, 10-1: 8862 (2020).
- Miyazaki, K., **Watanabe, H.**, Yoshikawa, G., Chen, K., Hidaka, R., Aitani, Y., Osawa, K., Takeda, R., Ochi, Y., Tani-ichi, S., Uehata, T., Takeuchi, O., Ikuta, K., Ogawa, S., **Kondoh, G.**, Lin, Y. C., Ogata, H., and Miyazaki, M. The transcription factor E2A activates multiple enhancers that drive Rag expression in developing T and B cells. *Science Immunology*, 5 (1455) (2020).
- Uchiyama, K., Miyata, H., Yamaguchi, Y., Imamura, M., Okazaki, M., Agriani Dini Pasiana, Chida, J., Hara, H., Atarashi, R., **Watanabe, H.**, **Kondoh, G.** and Sakaguchi, S. Strain-Dependent Prion Infection in

Mice Expressing Prion Protein with Deletion of Central Residues 91–106. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (19), 7260; <https://doi.org/10.3390/ijms21197260> (2020).

Hirotsune, S., Kiyonari, H., Jin, M., Kumamoto, K., Yoshida, K., Shinohara, M., **Watanabe, H.**, Wynshaw-Boris, A., and Matsuzaki, F. Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends. *Scientific Reports* 10:2518 (2020).

Nakato, M., Shiranaga, N., Tomioka, M., **Watanabe, H.**, Kurisu, J., Kengaku, M., Komura, N., Ando, H., Kimura, Y., Kioka, N., and Ueda, K. ABCA13 dysfunction associated with psychiatric disorders causes impaired cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbcRA120.015997> (2020).

廣田圭司 「Pathogenic ヘルパー T 細胞と組織炎症」: 医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社 274 卷 12 号 1214-9、2020 年 9 月 19 発行

廣田圭司 「Th17 細胞による関節炎惹起と慢性炎症の維持機構」: リウマチ科、科学評論社 63 卷 6 号 603-609、2020 年 6 月 28 発行

List of Presentations

廣田 圭司 : 自己免疫性関節炎の滑膜組織炎症における炎症性細胞サブセットの役割、第 38 回日本骨代謝学会学術集会、2020 年 10 月 9-11 日

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

生体再建学分野
Laboratory of Experimental Immunology

客員教授 坂口 志文 Visiting Prof. Shimon Sakaguchi

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

2020 年度、Treg の基礎研究では、前年度に引き続き、いかにして通常の T 細胞 (conventional T cells, 以下 Tconv と略) を Treg に機能的に転換可能か、について研究を進めた。Treg 機能には、Foxp3を中心とする転写因子ネットワークと Treg 特異的エピゲノム変化が重要である。前年度は、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 が誘導されうることを示した。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、これを用いて試験管内、生体で、Tconv に Foxp3 を誘導可能であることを示した (Akamatsu, Mikami, et al., *Sci. Immunol.* 2019)。今年度、Treg 特異的エピゲノムについて研究を進めた。Tconv に TGF- β で Foxp3 を誘導できるが、このような誘導性 Treg (induced Treg, iTreg) では Treg 特異的 DNA 脱メチル化は起こらず、機能的に不安定である。しかし、iTreg 誘導時に、CD28 を介する副刺激がなければ Treg 特異的脱メチル化、特に Foxp3 遺伝子の CNS2 領域の脱メチル化が成立することを見出した。その分子機構として、Tconv では、Treg 特異的 DNA 脱メチル化領域への NF- κ B 結合が脱メチル化に抑制的に機能しているが、これを解除すれば、Treg 特異的脱メチル化が惹起される、との結果を得た。このように作製した Treg は機能的に安定であり、これを投与することで生体内での免疫反応を抑制し、またアレルギー反応に対して治療効果を確認した (Mikami, Kawakami et al., *PNAS*, 2020)。

前年度より継続して腫瘍免疫における Treg の役割について研究を進めた。今年度、Treg を特異的に除去できる小分子の研究を進め、慢性骨髄性白血病 (CML) 治療に使われる imatinib には Treg 選択的除去作用があることを見出した。実際、CML 完全寛解例では effector Treg が選択的に減少しており、不完全寛解例では減少が見られなかった。Imatinib は BCR-ABL ガンタンパクを阻害し白血病細胞を傷害するが、off target として T 細胞に高発現するシグナル分子 Lck を阻害する。その結果による TCR 近傍シグナル阻害は Treg の選択的傷害、減少をもたらす。imatinib に関するこの知見は、CML に限らず、がん一般に対して応用可能であり、Treg を標的とし経口投与が可能な低分子薬剤による新しい癌免疫療法の可能性を意味する (Tanaka et al., *J. Exp. Med.* 2020)。

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

In 2020, we have continued to study how conventional T cells (Tconvs) can be converted to functionally stable Treg cells expressing the transcription factor Foxp3. It has been shown that Treg functions can be determined and maintained by the transcription factor network with Foxp3 at a key position as well as Treg-specific epigenetic changes. In the previous year, we showed that chemical inhibition of the cyclin-dependent kinases (CDK) 8/19, the regulatory domain of the Mediator complex, was able to induce Foxp3 in antigen-stimulated effector/memory as well as naïve CD4⁺ and CD8⁺ Tconvs *in vivo* and *in vitro* (Akamatsu, Mikami, et al., Sci. Immunol. 2019). Such *in vitro* induced Treg cells (iTregs), however, do not exhibit Treg-type epigenome, in particular, Treg-specific DNA hypomethylation. Addressing how Treg-specific epigenetic changes can be installed in iTregs, we have shown this year that deprivation of CD28 co-stimulatory signal at an early stage of iTreg generation is able to establish Treg-specific DNA hypomethylation at Treg signature genes including *Foxp3*. It can be achieved, for example, by TCR/TGF- β /IL-2 stimulation of CD28-deficient Tconvs or CD28-intact Tconvs without anti-CD28 agonistic mAb or with CD80/CD86-blocked or -deficient antigen-presenting cells. The CD28 signal abrogations could induce Treg-type hypomethylation in memory/effector as well as naive Tconvs, while hindering their differentiation into effector T cells. Among various cytokines and signal activators/inhibitors, TNF- α and PKC agonists inhibited the hypomethylation. Furthermore, CD28-signal deprivation significantly reduced c-Rel expression in iTregs; and the specific genomic perturbation of a NF- κ B-binding motif at the *Foxp3* CNS2 locus enhanced the locus-specific DNA hypomethylation even in CD28-signaling-intact iTregs. These iTregs indeed stably expressed Foxp3 after *in vivo* transfer and effectively suppressed antigen-specific immune responses. Taken together, inhibition of the CD28-PKC-NF- κ B signaling pathway in iTreg generation enables *de novo* acquisition of Treg-specific DNA hypomethylation at Treg signature genes and abundant production of functionally stable antigen-specific iTregs for therapeutic purposes (Mikami, Kawakami, et al., PNAS, 2020).

In our project addressing the roles of Tregs in tumor immunity, we have shown this year that chemical depletion of Treg cells is able to enhance effective tumor immunity. It can be achieved by imatinib, an inhibitor of the oncogenic BCR-ABL protein expressed in chronic myelogenous leukemia (CML) cells. Imatinib-treated CML patients in complete molecular remission showed selective depletion of effector Tregs (eTregs) whereas those who failed in molecular remission did not. Imatinib inhibited LCK, a T-cell specific signalling molecule. Since Lck gene transcription is specifically repressed by Foxp3 in Tregs, imatinib further reduced TCR proximal signal and thereby induced eTreg-selective apoptosis while allowing effector CD8⁺ T cells to respond against tumor cells. Thus, small molecules, such as imatinib, which can selectively deplete Treg cells by exploiting Treg-intrinsic signaling events are instrumental in augmenting anti-tumor immunity against various cancers (Tanaka et al., J. Exp. Med. 2020).

List of Publications

1) 原著論文

1. Tay C, Qian Y, Sakaguchi S. Hyper-progressive disease: The potential role and consequences of T-regulatory cells foiling anti-PD-1 cancer immunotherapy. *Cancer (Basel)*. 2020 Dec 26;13(1):E48. doi: 10.3390/cancers13010048.
2. Mikami N, Kawakami R, Sakaguchi S. New Treg cell-based therapies of autoimmune diseases: Towards antigen-specific immune suppression. *Curr. Opin. Immunol.* 2020 Aug 19;67:36-41. doi: 10.1016/j.co.2020.07.004.
3. Hsieh WC, Svensson MN, Zoccheddu M, Tremblay ML, Sakaguchi S, Stanford SM, Bottini N. PTPN2 links colonic and joint inflammation in experimental autoimmune arthritis. *JCI Insight*. 2020 Oct 15;5(20):e141868. doi: 10.1172/jci.insight.141868.
4. Yasumizu Y, Hara A, Sakaguchi S, Ohkura N. VIRTUS: a pipeline for comprehensive virus analysis from conventional RNA-seq data. *Bioinformatics*. 2020 Oct 5;btaa859. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa859.
5. Shime H, Odanaka M, Tsuji M, Matoba T, Imai M, Yasumiza Y, Uraki R, Minohara K, Watanabe M, Bonito AJ, Fukuyama H, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A, Yamazaki S. Proenkephalin⁺ regulatory T cells expanded by ultraviolet-B exposure maintain skin homeostasis with a healing function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. August 25, 2020 117 (34) 20696-20705.
6. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, and Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Ann. Rev. Immunol.* 2020 Apr 26;38:541-566. doi: 10.1146/annurev-immunol-042718-041717.
7. Shigeta N, Kumasawa K, Tanaka A, Badger Wing J, Nakamura H, Sakaguchi S, Kimura T. Dynamics of effector and naïve Regulatory T cells throughout pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2020 Apr 19;140:103135. doi: 10.1016/j.jri.2020.103135.
8. Kawashima A, Kanazawa T, Kidani Y, Yoshida T, Hirata M, Nishida K, Nojima S, Yamamoto Y, Kato T, Hatano K, Ujike T, Nagahara A, Fujita K, Morimoto-Okazawa A, Iwahori K, Uemura M, Imamura R, Ohkura N, Morii E, Sakaguchi S, Wada H, Nonomura N. Tumour grade significantly correlates with total dysfunction of tumour tissue-infiltrating lymphocytes in renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2020 Apr 10;10 (1):6220. doi: 10.1038/s41598-020-63060-1.
9. Takeuchi Y, Hirota K, Sakaguchi S. Impaired T cell-receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis. *Immunol. Rev.* 2020 Mar;294 (1):164-176. doi: 10.1111/imr.12841.
10. Wing JB, Lim Lyn E, Sakaguchi S. Control of foreign Ag-specific Ab responses by Treg and Tfr. *Immunol. Rev.* 2020 Jul;296 (1):104-119. doi: 10.1111/imr.12888.
11. Ohkura N, Sakaguchi S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases. *Cell Res.* 2020 Jun;30 (6):465-474. doi: 10.1038/s41422-020-0324-7..

12. Mikami N, Kawakami R, Chen KY, Sugimoto A, Ohkura N, Sakaguchi S. Epigenetic conversion of conventional T cells into regulatory T cells by CD28 signal deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117 (22):12258-12268. doi: 10.1073/pnas.1922600117. (2020)
13. Ohkura N, Yasumizu Y, Kitagawa Y, Tanaka A, Nakamura Y, Motooka D, Nakamura S, Okada Y, Sakaguchi S. Regulatory T Cell-Specific Epigenomic Region Variants Are a Key Determinant of Susceptibility to Common Autoimmune Diseases. *Immunity*. 52:1119-1132.e4 (2020). doi: 10.1016/j.jimmuni.2020.04.006
14. Nishida K, Kawashima A, Kanazawa T, Kidani Y, Yoshida T, Hirata M, Yamamoto K, Yamamoto Y, Sawada M, Kato R, Kato T, Hatano K, Ujike T, Fujita K, Uemura M, Morimoto-Okazawa A, Iwahori K, Yamasaki M, Ohkura N, Sakaguchi S, Nonomura N, Doki Y, Wada H. Clinical importance of the expression of CD4+CD8+ T cells in Renal Cell Carcinoma. *Int Immunol*. 2020 May 8;32 (5):347-357. doi: 10.1093/intimm/dxaa004.
15. Tanaka A, Nishikawa H, Noguchi S, Sugiyama D, Morikawa H, Takeuchi Y, Ha D, Shigeta N, Kitawaki T, Maeda Y, Saito T, Shinohara Y, Kameoka Y, Iwaisako K, Monma F, Ohishi K, Karbach J, Jäger E, Sawada K, Katayama N, Takahashi N, Sakaguchi S. Tyrosine kinase inhibitor imatinib augments tumor immunity by depleting effector regulatory T cells. *J. Exp. Med.* (2020) 217(2): e20191009. doi: 10.1084/jem.20191009, 2020.

2) 総説

大倉永也・坂口志文：制御性T細胞 週刊医学のあゆみ Vol.274 No.11 1128-1133 2020

三上統久・坂口志文：化合物によるTreg誘導 週刊医学のあゆみ Vol.275 No.1 84-89 2020

三上統久・坂口志文：安定で機能的な制御性T細胞の効率的製作法 実験医学 Vol.38 No.17 (増刊) 143-148 (2935-2940) 2020

三上統久・坂口志文：CD28シグナル抑制による誘導性Tregの生成 臨床免疫・アレルギー科 Vol75 No.3 238-244, 2021

安水良明・大倉永也：制御性T細胞特異的エピゲノムは、自己免疫疾患感受性に強く影響する 臨床免疫・アレルギー科 Vol75 No.3 253-258, 2021

3) 学会等の講演

1) 学会・研究会発表

大倉永也：制御性T細胞をターゲットとした抗腫瘍免疫 日本がん免疫学会 (2020.6.10-12. 札幌／Web meeting)

大倉永也：制御性T細胞、その価値は？ バイオセラピー学会 2020 (2020.11.19-20. 福岡／Web)

meeting)

大倉永也：BD Rhapsody を用いたシングルセル解析の実際 BD 社主催ウェビナー（2021.2.25. Web meeting）

2) 講演・シンポジウム

Shimon Sakaguchi: Molecular targeting of Treg cells for controlling immune responses. JSA/WAO Joint Congress 2020（第 69 回日本アレルギー学会学術大会）(2020.9.24. 京都)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 27 回大阪小児感染免疫カンファレンス(2020.9.26. 大阪)

坂口志文：免疫学とこれからの社会～自分の道を信じて進む勇気～ 長浜市の次世代を担う人材育成講演会（2020.9.27. 滋賀）

Shimon Sakaguchi: Basic aspects of Treg biology related to self-tolerance and autoimmune disease, and Treg-based therapeutic approach to autoimmune diseases. Rheuma Tolerance for Cure Annual Meeting (2020.9.29. Web meeting) 国外

Shimon Sakaguchi: Molecular targeting of regulatory T cells for treatment of immunological diseases. FOCIS (2020.11.10. Web meeting) 国外

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. Robert Koch Lecture (2020.11.16. Web meeting) 国外

Shimon Sakaguchi: Treg-specific epigenetic variations and susceptibility to common autoimmune diseases. Immunogenomics of Disease: Accelerating to Patient Benefit (2021.2.10-12. Web meeting) 国外

(賞)

Scientific Achievement Award (World Allergy Organization)

Robert Koch Award

日本内分泌学会マイスター賞

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、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、また、発現量が増すと、トライマー以上の会合体も生じ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り、会合体形成を制御する仕組みを理解することが重要で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、それを担い、統合する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。

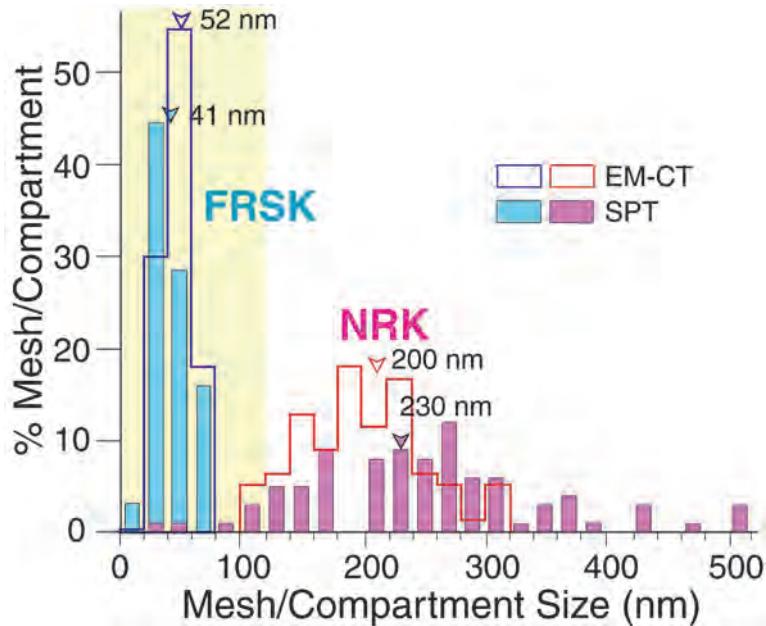


図1. 細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オーブンバーで示す。赤が NRK 細胞、青が、FRSK 細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

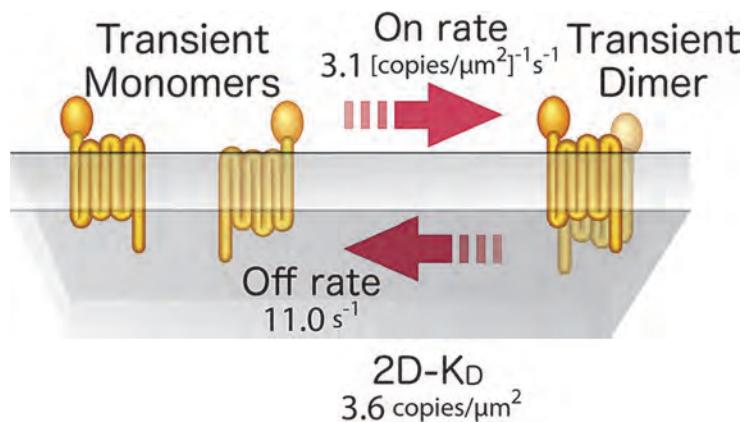


図2. 細胞膜に存在するG蛋白質共役型受容体(GPCR)を、細胞内蛍光1分子観察法を用いて調べる事で、動的なモノマー・ダイマー平衡を解明した。ダイマーのオフレート、オンレート、2次元の平衡定数をそれぞれ示す。モノマーと、ダイマーは共存するが、両者は常に動的に交換している。

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 characteristics 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 ~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 and oligomers in live cells (Nishiguchi et al., 2020). Based on these results, it was found that the dynamic dimer-monomer equilibrium is probably a newly identified characteristics 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 ~100 milliseconds. Furthermore, the transient dimerization of GPCR seems to be related to its signal generation and regulation.

List of Publications

- Koyama-Honda, I., Fujiwara, T.K., Kasai, R.S., Suzuki, K.G.N., Kajikawa, E., Tsuboi, H., Tsunoyama, T.A., and Kusumi, A. (2020) High-speed single-molecule imaging reveals signal transduction by induced transbilayer raft phases. **J. Cell Biol.** doi: 10.1083/jcb.202006125.
- Nishiguchi, T., Yoshimura, H., Kasai, R.S., Fujiwara, T.K., and Ozawa, T. (2020) Synergetic roles of Formyl Peptide Receptor 1 oligomerization in ligand-induced signal transduction. **ACS Chem. Biol.** doi: 10.1021/acscchembio.0c00631.
- Muraoka, T., Noguchi, D., Kasai, R.S., Sato, K., Sasaki, R., Tabata, K., Ekimoto, T., Ikeguchi, M., Kamagata, K., Hoshino, N., Noji, H., Akutagawa, A., Ichimura, K., and Kinbara, K. (2020) A synthetic ion channel with anisotropic ligand response. **Nat. Commun.** 11, 2924.

List of Invited Presentations

- 笠井倫志 蛍光1分子観察法による細胞膜中の分子の動態と機能の解明：会合体形成とダイナミクス．第10回CSJ化学フェスタ2020“発動分子科学の挑戦～「分子が働く世界」の創造へ～”．ウェブ会議での開催、2020年10月20日
- 笠井倫志 蛍光1分子観察法による膜分子の動態観察と機能の解明：G蛋白質共役型受容体の動的なモノマー・ダイマー変換．日本化学会 第100春季年会シンポジウム“新学術領域研究『発動分子科学』報告会～化学者と物理系および生物系研究者がコラボレーションする発動分子～”．ウェブ会議での開催、2020年3月23日

List of Presentations

- Kasai, R.S., and Nemoto, Y.L. Single molecule observation of adhesion GPCR accumulated at the cell-cell interface. 第58回日本生物物理学会年会、ウェブ会議での開催、2020年9月16-18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	Sr. Lect.	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。2020年においては、骨リモデリングの時空間的な振舞いをコンピュータ内で詳細に解析可能な *in silico* 実験基盤を開発した。また、磁気ピンセットを用いて骨細胞に力学刺激を加えることにより、力学的過負荷を受けた骨細胞が細胞質における急激な一酸化窒素産生によりアポトーシスすることを示した。

1) 骨リモデリングの *in silico* 実験基盤の開発

骨の構造と機能は、骨吸収と骨形成の代謝バランスにより維持されており、それらのバランスが崩れると、骨粗しょう症などの代謝性骨疾患が引き起こされる。この骨リモデリングの詳細な分子・細胞メカニズムは次第に明らかになりつつあるが、骨代謝に関与する細胞間のシグナル伝達経路は非常に複雑なため、骨疾患時や薬物治療過程において、リモデリングによる骨の形態変化を予測することは困難である。そこで本研究では、分子・細胞の相互作用と組織・器官の形態変化とを関連付けた骨リモデリングの数理モデルを提案し、それを組み込んだ骨リモデリングの *in silico* 実験基盤を開発した。この *in silico* 実験基盤を用い、コンピュータ内に構築した仮想的なマウス大腿骨に対してさまざまな実験操作を加え、内部に存在する網目状の海綿骨の形態変化を調べた。まず、力学負荷の減少やシグナル分子の分泌異常にともなう代謝性骨疾患の病態をコンピュータ内で再現することに成功した。また、特定のシグナル分子 (Sema3A) の発現を任意に変動させる *in silico* 実験を行い、*in vivo* 実験では困難な骨リモデリングの時空間的挙動の観察を可能にした (Fig. 1)。さらに、医療応用を見据えた *in silico* 投薬実験を行い、骨粗しょう症に対する様々な薬物治療効果の予測を試みることにより、開発した *in silico* 実験基盤の有用性を示した。

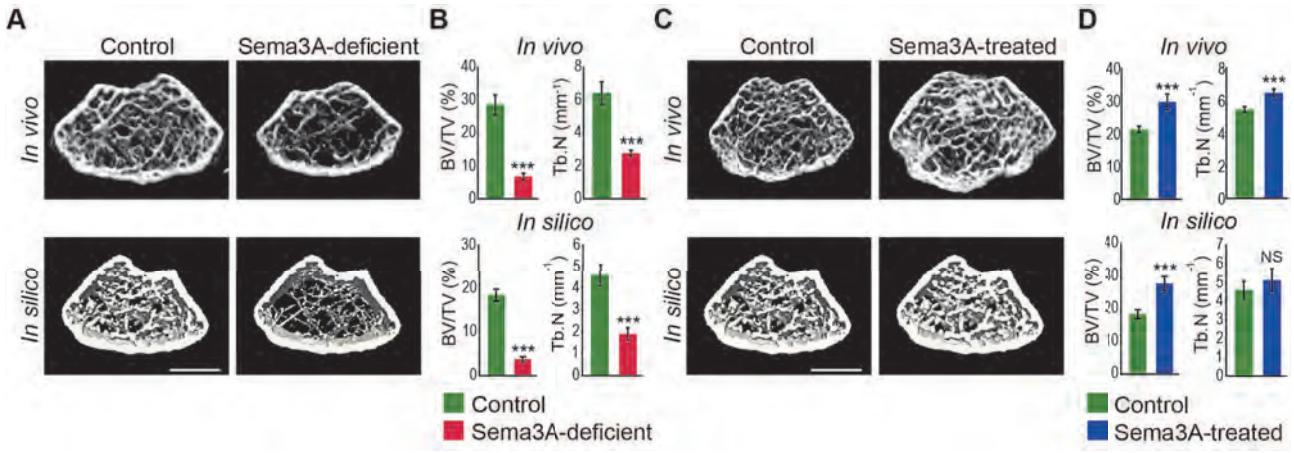


Fig. 1. In silico perturbation of Sema3A compared with corresponding in vivo experiments. (A) Cancellous bone morphology in Sema3A-deficient mouse femurs. (B) Bone volume fraction (BV/TV) and trabecular number (Tb.N) in Sema3A-deficient mouse femurs. (C) Cancellous bone morphology in Sema3A-treated mouse femurs. (D) BV/TV and Tb.N in Sema3A-treated mouse femurs. (Kameo et al., 2020)

2) 力学的過負荷に起因する骨細胞のアポトーシスの機構解明

骨に蓄積された損傷は、骨吸収と呼ばれる代謝作用により除去される。骨吸収は、損傷により生じる過荷重領域において、骨細胞のアポトーシスにより促進されることが示唆されている。このように、骨細胞のアポトーシスは、骨の構造維持において重要であるにも関わらず、力学的過負荷をアポトーシスと関連付ける因子は不明であった。そこで本研究は、細胞質内の一酸化窒素（NO）に着目することで、力学的過負荷に起因する骨細胞のアポトーシス機構の一端を新たに明らかにした。マウス頭蓋冠由来の単離骨細胞に対し、磁気ピンセットを用いて定量的な力学刺激を加えた結果、負荷する力の増加にともない、細胞質内の NO 指示薬 (DAR-4 M) の輝度が急激に上昇し、アポトーシス初期の兆候である細胞収縮が観察された (Fig. 2)。この細胞収縮は、L-NAME による NO 産生阻害下では生じなかったことから、力学的過負荷を受けた骨細胞は、細胞質内における NO 産生によりアポトーシスすることが示唆された。

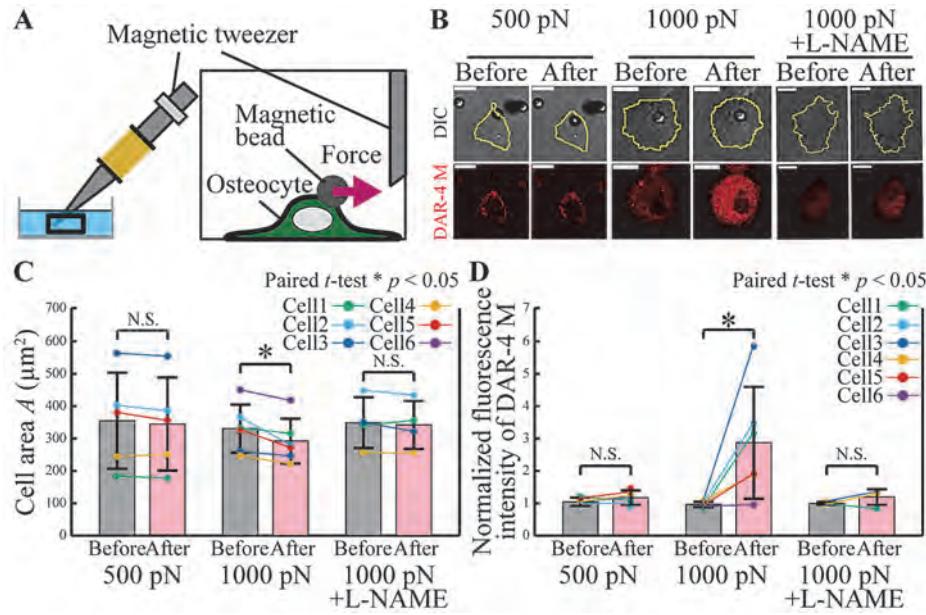


Fig. 2. Apoptotic cell shrinkage and NO production in mechanically stimulated osteocytes. (A) Schematic of mechanical stimulation applied to osteocytes using a magnetic tweezer. Cell morphology/intracellular NO was microscopically observed (B), followed by quantitative analysis (C and D) before and after applying mechanical stimulation. (Nakao et al., 2021)

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 2020, we developed a novel *in silico* experimental platform to investigate spatial and temporal behavior of bone remodeling regulated by mechano-biochemical couplings. In addition, we showed that applying mechanical overload using a magnetic tweezer to osteocytes evoked the apoptosis mediated by intracellular nitric oxide production.

1) Development of an *in silico* experimental platform to explore bone remodeling

Bone homeostasis via remodeling can be disrupted by an imbalance between bone resorption and formation, resulting in metabolic bone diseases such as osteoporosis. Even though the underlying molecular and cellular mechanisms of bone remodeling are now being clarified, the complexity of intercellular signaling makes it difficult to predict the changes in bone morphology during bone diseases and their drug treatment. In this study, we developed a novel *in silico* experimental platform to integratively explore bone remodeling by linking microscopic molecular/cellular interactions to macroscopic tissue/organ adaptations. Using this platform, we conducted *in silico* experiments to investigate the morphological changes of cancellous bone in a mouse femur subjected to mechanical loading. The *in silico* experiments successfully reproduced pathologies of metabolic bone diseases due to loss of mechanical stress and abnormal expression of signaling molecules. Furthermore, *in silico* perturbation of a specific signaling molecule (Sema3A) enabled observation of the

spatiotemporal dynamics of bone remodeling, which is difficult to achieve *in vivo* (Fig. 1). As a clinical application of the proposed platform, *in silico* medication experiments was shown to provide a powerful way to predict the therapeutic effects of drugs against metabolic bone diseases.

2) Elucidating the mechanism of osteocyte apoptosis induced by mechanical overload

Bone damage causes local mechanical overloading to induce osteocyte apoptosis, which is suggested to promote the bone resorption at the damaged region. Despite the importance of the osteocyte apoptosis with regard to the structural integrity of the bone, a direct correlation between mechanical overloading and osteocyte apoptosis remains still unknown. In this study, we for the first time revealed the mechanism underlying apoptosis in mechanically overloaded osteocytes, focusing on intracellular nitric oxide (NO). Primary osteocytes isolated from mice calvariae were subjected to quantitative mechanical stimulation using a magnetic tweezer. Consequently, a drastic increase in fluorescence intensity of a NO indicator (DAR-4 M) in response to stimulation with a large magnitude force was microscopically observed, accompanied by early-apoptotic cell shrinkage (Fig. 2). In the presence of a NO synthesis inhibitor, L-NAME, the cell shrinkage induced by the mechanical stimulation was suppressed. Thus, we proposed that the mechanically overloaded osteocytes underwent apoptosis in a manner mediated by the intracellular NO production.

List of Publications

1. 論文

- Takeda, H., Kameo, Y., Adachi, T. (2020). Continuum Modeling for Neuronal Lamination during Cerebral Morphogenesis Considering Cell Migration and Tissue Growth., **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, Online published.
- Tran, A. K., Kawashima, D., Sugarawa, M., Obara, H., Okeyo, K.O., Takei, M. (2020). Development of a noise elimination electrical impedance spectroscopy (neEIS) system for single cell identification. **Sensing and Bio-Sensing Research**, Vol. 30, #100381.
- Kim, J., Adachi, T. (2020). Modulation of Sost Gene Expression under Hypoxia in 3D Scaffold-free Osteocytic Tissue. **Tissue Engineering Part A**, online published.
- Scheuren, A.C., Vallaster, P., Kuhn, G.A., Paul, G.R., Malhotra, A., Kameo, Y., Müller, R. (2020). Mechano-Regulation of Trabecular Bone Adaptation Is Controlled by the Local *in vivo* Environment and Logarithmically Dependent on Loading Frequency, **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Vol. 8, #566346.
- Suzuki, D., Otsubo, H., Adachi, T., Suzuki, T., Nagoya, S., Yamashita, T., Shino, K. (2020). Functional Adaptation of the Fibrocartilage and Bony Trabeculae at the Attachment Sites of the Anterior Cruciate Ligament. **Clinical Anatomy**, Vol. 33, pp. 988-996.

- Kim, J., Ushida, T., Montagne, K., Hirota, Y., Yoshino, O., Hiraoka, T., Osuga, Y., Furukawa, K.S. (2020). Acquired contractility ability in human endometrial stromal cells by passive loading of cyclic tensile stretch. **Scientific Reports**, Vol. 10, #9014.
- Kameo, Y., Sakano, N., Adachi, T. (2020). Theoretical Concept of Cortical to Cancellous Bone Transformation. **Bone Reports**, Vol. 12, #100260.
- Kim, J., Kigami, H., Adachi, T. (2020). Characterization of Self-organized Osteocytic Spheroids Using Mouse Osteoblast-like Cells. **Journal of Biomechanical Science and Engineering**, Vol. 15, No. 3, #20-00227.
- Inoue, Y., Tateo, I., Adachi, T. (2020). Epithelial Tissue Folding Pattern in Confined Geometry. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, Vol. 18, No. 3, pp. 815-822.
- Kawabata, K., Charoensombut, N., Kim, J., Kimura, T., Kishida, A., Ushida, T., Furukawa, K.S. (2020). Fabrication of extracellular matrix hydrogel derived from uterine tissue. **Japanese Journal of Clinical Biomechanics**, Vol. 41, pp. 287-291.
- Kanda, E., Epureanu, B.I., Adachi, T., Tsuruta, Y., Kikuchi, K., Kashihara, N., Abe, M., Masakane, I., Nitta, K. (2020). Application of Explainable Ensemble Artificial Intelligence Model to Categorization of Hemodialysis-patient and Treatment Using Nationwide-real-world Data in Japan. **Plos One**, Vol. 15, No. 5, #e0233491.
- Ueda, Y., Kimura-Yoshida, C., Mochida, K., Tsume, M., Kameo, Y., Adachi, T., Lefebvre, O., Hiramatsu, R., Matsuo, I. (2020). Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane are Crucial for Early Mouse Morphogenesis. **Cell Reports**, Vol. 31, #107637.
- Takeda, H., Kameo, Y., Inoue, Y., Adachi, T. (2020). An Energy Landscape Approach to Understanding Variety and Robustness in Tissue Morphogenesis. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, Vol. 19, pp. 471-479.
- Kameo, Y., Miya, Y., Hayashi, M., Nakashima, T., Adachi, T. (2020). In Silico Experiments of Bone Remodelling Explores Metabolic Diseases and their Drug Treatment. **Science Advances**, Vol. 6, No. 10, #eaax0938.
- Sasaki, F., Hayashi, M., Mouri, Y., Nakamura, S., Adachi, T., Nakashima, T. (2020). Mechanotransduction via the Piezol-Akt Pathway Underlies Sost Suppression in Osteocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 521, No. 3, pp. 806-813.

2. 書籍・総説等

安達泰治 (2020). 計算機で骨の形態をリモデリングする 23 の先端事例がつなぐ計算科学のフロンティア (編: 中村振一郎、牧野内昭武、安達泰治、杉本学) 第 5 章、pp. 60-70、I、近代科学社

List of Presentations

1. 講演・シンポジウム

Adachi, T. In Silico Modeling of Bone Metabolism and Remodeling. <Invited> Japan Bone Academy, 東京 Online, December 20-23, 2020.

金英寛 数理モデルおよび計算機シミュレーションによる骨代謝・治療ダイナミクス解析 旭化成 ファーマ株式会社 社内講演会、東京 Online、2020 年 12 月 11 日 <Invited>

亀尾佳貴 多細胞システムにより創発される骨の構造と機能の力学的適応の数理モデリング 日本学術会議 第 10 回計算力学シンポジウム、Online、2020 年 12 月 7 日

金英寛 骨代謝数理モデルの骨粗鬆症治療シミュレーションへの応用 第 35 回日本整形外科学会 基礎学術集会、基礎研究に裏付けられた臨床応用、1-5-CB2-2、東京 Online、2020 年 10 月 15-16 日 <Invited>

安達泰治 骨代謝数理モデルの基礎と in silico 実験 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会、基礎研究に裏付けられた臨床応用、1-5-CB2-1、東京 Online、2020 年 10 月 15-16 日 <Invited>

安達泰治 生体組織の形態形成・機能的適応を力学的に理解する：多階層バイオメカニクス 第 24 回関西大学先端科学技術シンポジウム、p. 194、吹田、2020 年 1 月 24 日 <Invited>

オケヨ・ケネディ・オモンディ 細胞の微小接着空間制御による自己組織化誘導 電気学会研究会「光・量子デバイス研究会」、姫路、2020 年 1 月 8 日 <Invited>

2. 研究会・セミナー

Okeyo, K.O. Tuning the Adhesion Landscape to Derive Self-organization and Differentiation. Cell Biology, Developmental Biology and Systems Biology Course, and Faculty of Biostudy Annual Retreat, Otsu, January 25-26, 2020.

Okeyo, K.O., Ando, Y., Kibe, Y., Adachi, T. Self-organization and Differentiation of Stem Cells by Modulating the Adhesion Microspace. 京都大学メディカルイノベーション卓越大学院プログラム「医薬系研究交流サロン」、京都，January 29, 2020.

Adachi, T., Nakashima, T. Bone Mechanobiology: In Silico Experiments of Bone Remodeling. AMED-CREST 「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療機器及び医療技術の創出」令和元年度領域会議，名古屋，February, 6-7, 2020.

Okeyo, K.O., Kibe, Y., Adachi, T. Cell Alignment Instructed by Geometry Mechanosensing. AMED-CREST 「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療機器及び医療技術の創出」令和元年度領域会議，名古屋，February, 6-7, 2020.

Kim, J. Three-dimensional Osteocytic in vitro Model Reconstructed by Pre-osteoblast Cells. The 1st Bioengineering Seminar of the Korean Scientists and Engineers Associate in Japan, Online, August 1,

2020.

Kim, J. In vitro Osteocytogenesis Triggered by 3D Scaffold-free Culture Model. The Medical & Mechanical Engineering Seminar in Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST), Online, December 9, 2002.

オケヨ・ケネディ 微細加工技術に基づいた細胞機能創成とその応用可展開 第98回大阪大学工業会機械工学系技術交流会、吹田、2020年1月31日

安達泰治 バイオメカニクスの応用：骨リモデリング・代謝の *in silico* モデリング AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性骨軟骨疾患に対する革新的 iPS 創薬技術の開発と応用」令和元年度拠点運営会議、京都、2020年2月28日

安達泰治 多階層バイオメカニクス：形態形成と機能的適応における力の役割 第11回ウイルス再生研交流セミナー、京都 Online、2020年7月30日

安達泰治 骨病変の評価に向けた骨のマイクロ損傷と修復の数理バイオメカニクス AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性骨軟骨疾患に対する革新的 iPS 創薬技術の開発と応用」令和元年度拠点運営会議、京都 Online、2020年11月6日

安達泰治 骨構造の機能的適応の力学 建築学と異領域のダイアローグ、シンポジウム2「建築形態の数理」、京都 Online、2020年12月16日

亀尾佳貴 細胞の増殖と移動による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5回領域班会議、Online、2020年8月24-25日

3. 学会講演

Okeyo, K.O., Ando, Y., Adachi, T. Instructive Cell Adhesion Microenvironment Direct Self-organization and Differentiation of Stem Cells. The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2020), Online, October 4-9, 2020.

Kim, J., Adachi, T. Cell Condensation Acquired in Three-dimensional Culture System Triggers Osteocyte Differentiation of Pre-osteoblast Cells. 第47回日本臨床バイオメカニクス学会, O6-6, 新潟 Online, November 6-7, 2002.

新見夕姫、田邊麻衣子、大山国夫、半澤宏子、オケヨ・ケネディ、武田志津 マイクロメッシュ培養技術を用いたヒト iPS 細胞から栄養外胚葉様細胞への分化誘導技術の開発 第19回日本再生医療学会総会、Online、2020年5月18-29日

玉井龍太郎、オケヨ・ケネディ、安達泰治 マイクロメッシュによる細胞接着空間制御に基づく血管内皮細胞シートの作製とそのバリア機能の評価 第59回日本生体医工学会大会、岡山 Online、2020年5月25-27日

福手淳平、牧功一郎、安達泰治 ATP 枯渇条件における細胞核内 DNA ライブイメージング 日本バイオレオロジー学会誌、Vol. 34、No. 2、p. 21、札幌（誌上開催）、2020 年 6 月 17 日

金英寛、亀尾佳貴、安達泰治、田中栄 骨粗粗鬆症治療におけるリモデリング・モデリング調節と骨形態変化の数理シミュレーション 第 40 回日本骨形態計測学会、Vol. 30、No. 1、p. S118、岡山（誌上開催）、2020 年 6 月 18-20 日

亀尾佳貴、横山優花、上岡寛、安達泰治 イメージベース流体-構造連成解析による骨細管内細胞突起の局所ひずみ評価 第 40 回日本骨形態計測学会、Vol. 30、No. 1、p. S138、岡山（誌上開催）、2020 年 6 月 18-20 日

川井俊介、須長純子、松田秀一、安達泰治、戸口田淳也 ヒト iPS 細胞による *in vitro* 骨形成過程再現系の構築とその解析 第 38 回日本骨代謝学会学術集会、代 2-01、神戸 Online、2020 年 10 月 9-11 日

キム・ジョンヒョン、安達泰治 3 次元スキャフォールドフリースフェロイド化による *in vitro* での骨細胞分化誘導 第 38 回日本骨代謝学会学術集会、代 2-03、神戸 Online、2020 年 10 月 9-11 日

安達泰治、寺澤良亮、亀尾佳貴 骨のマイクロダメージ蓄積と修復の *in silico* モデリング 第 47 回日本臨床バイオメカニクス学会、O6-2、新潟 Online、2020 年 11 月 6-7 日

上田陽子、木村（吉田）千春、持田京子、爪麻美、亀尾佳貴、安達泰治、Olivier Lefebvre、平松竜司、松尾勲 子宮内圧による球形から卵円筒形への胚形態の変化がマウスの前後軸形成には必要である 第 43 回日本分子生物学会年会、2AW-08-2、Online、2020 年 12 月 2-4 日

福手淳平、牧功一郎、安達泰治 DNA 超らせん形成が核内クロマチンのアクセシビリティに与える効果 日本機械学会第 31 回バイオフロンティア講演会、No. 20-44、#1A20、上田 Online、2020 年 12 月 12-13 日

玉井龍太郎、オケヨ・ケネディ、安達泰治 微細構造基板を用いた自己組織化誘導による脳血管内皮細胞のバリア形成とその評価 日本機械学会第 31 回バイオフロンティア講演会、No. 20-44、#1A24、上田 Online、2020 年 12 月 12-13 日

Tran, A. K., Kawashima, D., Sugawara, M., Obara, H., Okeyo, K.O., Takei, M. 単一細胞同定のためのノイズ除去電気インピーダンス分光法 (neEIS) システム 日本機械学会第 31 回バイオフロンティア講演会、#1A14、Online、2020 年 12 月 12-13 日

木上博之、Jeonghyun Kim、安達泰治 骨芽細胞様細胞を用いた三次元骨細胞スフェロイドの評価 日本機械学会第 31 回バイオフロンティア講演会、No. 20-44、#1A26、上田 Online、2020 年 12 月 12-13 日

坂野暢昭、亀尾佳貴、安達泰治 骨リモデリングを制御する力学刺激としての間質液流れの *in vivo*・*in silico* 検討 日本機械学会第 31 回バイオフロンティア講演会、No. 20-44、#1B28、上田 Online、

2020年12月12-13日

亀尾佳貴、坂野暢昭、安達泰治 リモデリングによる皮質骨—海綿骨転換の数理モデリング 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会、No. 20-44、#1B29、上田Online、2020年12月12-13日

竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 細胞移動と組織成長から生じる脳形態形成の有限要素解析 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会、No. 20-44、#1C16、上田Online、2020年12月12-13日

横山優花、亀尾佳貴、上岡寛、安達泰治 骨細胞の流れ刺激感知におけるテザリングエレメントの力学的役割 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会、No. 20-44、#1C24、上田Online、2020年12月12-13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、嗅覚受容器官である嗅上皮組織を幹細胞から試験管内で再構成する技術を確立した。

マウスやヒトなどの哺乳類は、五感を介して外界の情報を認識している。その中でも嗅覚は、餌となる物質への誘引、危険からの忌避、フェロモンを介したパートナーの識別など、哺乳動物の生存にとって重要な役割を果たす。マウスでは、約 1,000 種類の限られた嗅覚受容体で数十万種類に及ぶ膨大な匂い分子を識別するために、嗅覚神経系は独自の精密な神経回路形成機構を有している。これまでのマウスなどのモデル動物を用いた研究により、嗅覚神経系の発生メカニズムに関する多くの知見が得られているが、その全貌は未だに解明されていない。

近年、オルガノイドと呼ばれる試験管内で臓器を再現した構造体が、生物の発生や疾患のモデルとして幅広く用いられている。オルガノイドを用いることで、*in vitro* において組織発生を再現し、その過程を詳細に観察することができるため、従来のモデル動物を用いた研究では不可能であった解析を可能にすると考えられる。これまでに大脳皮質や網膜など、様々な組織のオルガノイドの作製が報告されているが、嗅覚組織のオルガノイドは現状存在しない。

そこで本研究では、マウスの体性幹細胞やヒト ES 細胞を用いて、嗅覚組織の一部である嗅上皮

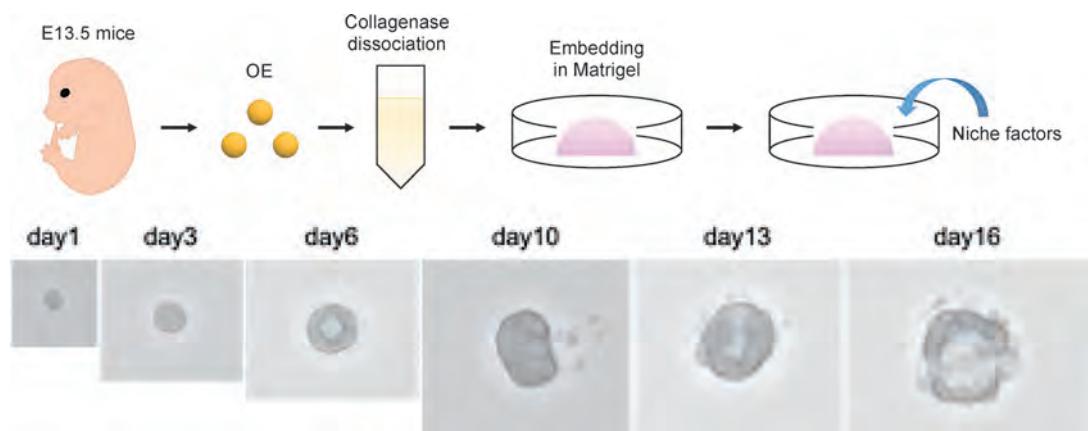


図 1：マウス体性幹細胞からのオルガノイド形成

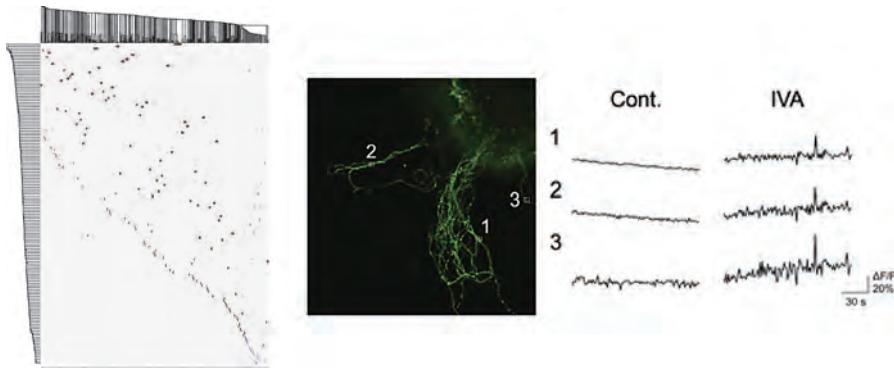


図2：オルガノイドの嗅覚受容体発現パターンと臭い物質に対するカルシウム応答

(olfactory epithelium; OE) のオルガノイドを作製する技術を確立した。

胎生13.5日目 (E13.5) のマウスから嗅上皮を摘出し、シングルセルに分散した後 Matrigel に包埋した。そこに、嗅上皮内の幹細胞の維持に必要なニッチ因子 (Niche factors) を添加し培養を行った (図1)。その結果、培養10日目付近でシスト状の三次元構造体が形成され、培養30日目まで維持された。以下この三次元構造体を嗅上皮オルガノイドと呼ぶ。

嗅上皮オルガノイドを構成する細胞種を同定するため、免疫染色を行った。その結果、嗅上皮オルガノイドには嗅神経細胞に発現する Tuj1、嗅上皮の非神経細胞（基底細胞と支持細胞）に発現する Sox2 を発現している細胞が含まれていることが明らかとなった。また、嗅上皮オルガノイドの内側には apical マーカーである aPKC が発現しており、このオルガノイドが apical-basal 極性を持っていることも示された。オルガノイド内の嗅神経細胞と非神経細胞は apical-basal 軸に沿って層構造を形成しており、嗅上皮オルガノイドは構造的にも生体内の嗅上皮を模倣していると考えられる。

嗅上皮オルガノイドに含まれる細胞種や細胞の状態をより詳細に解析するため、single cell RNA sequence (scRNA-seq) を行った。その結果、嗅上皮オルガノイドには、生体内の嗅上皮を構成するほぼ全種類の細胞が含まれていることが明らかとなった。また、オルガノイド内の嗅神経細胞の約半数が、in vivo と同様に 1 種類のみの嗅覚受容体を発現しており、これらの嗅神経細胞は臭い物質に対するカルシウム応答を示すことから成熟した状態にあることがわかった (図2)。さらに、嗅覚受容体の発現パターンと、嗅覚神経系の回路形成に重要な軸索選別因子やイオンチャネルの発現パターンに相関関係があることも示唆された。これらの結果から、嗅上皮オルガノイドは嗅覚神経系の発生メカニズムを解析するためのツールとして活用することができると考えられる。

The process of organogenesis in the brain, heart, and other organs is an extremely complex phenomenon that involves cell proliferation, differentiation, and migration. In order to understand the principles of organogenesis and to reproduce functional organogenesis *in vitro*, we have developed *in vitro* tissue formation technology (organoid) using pluripotent stem cells (ES/iPS cells) and analyzing the formation process to clarify the molecular mechanisms by which cells cooperate to form functional organs. In this year, we had developed a novel methodology for *in vitro* formation of functional olfactory epithelium from stem

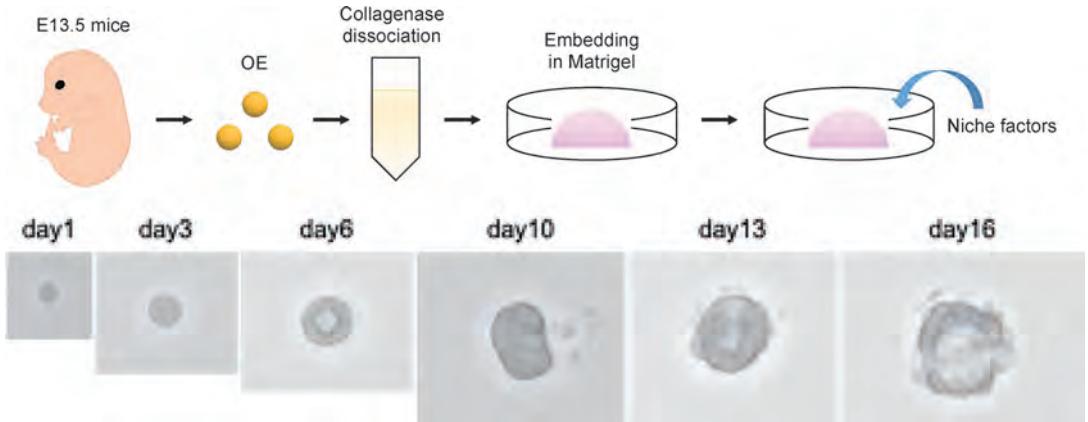


Fig1 : Organoid formation from mouse embryonic olfactory stem cells

cells.

The olfactory epithelium (OE) is a pseudostratified epithelium derived from the olfactory placode composed of cells with different functions. In contrast with the central nervous system, the mammalian OE retains a lifelong ability to renew neurons and rebuild functional neural circuits in response to injury. Therefore, the OE has studied as a model for neurogenesis, neural circuit formation, and organ regeneration. In mammals, each olfactory sensory neuron (OSN) expresses only one functional odorant receptor (OR) gene in a mutually exclusive manner—a phenomenon called the “one-neuron-one-receptor” rule. Moreover, OSNs that express the same type of OR project their axons to a specific target glomerulus in the olfactory bulb (OB) —a phenomenon called the “one-glonerulus-one-receptor” rule. Based on these two rules, mice can maintain neural circuits for olfaction throughout their lives to detect more than 100,000 different odorants using about 1,000 ORs.

In recent years, organoids have been widely used as models for organ development and disease. The use of organoids allows us to recapitulate tissue development *in vitro* and to observe the process in detail, which is not possible with conventional animal models. Although organoids of various tissues, such as cerebral cortex and retina, have been reported, there are currently no organoids of olfactory tissues.

In this study, the olfactory epithelium was harvested from embryonic day 13.5 (E13.5) mice, dispersed into single cells, and embedded in Matrigel. Niche factors, which are necessary for the maintenance of stem cells in the olfactory epithelium, were added to the cells and cultured (Fig. 1). As a result, cyst-like three-dimensional structures were formed and maintained until the 30th day of culture. These three-dimensional structures are referred to as olfactory epithelial organoids.

To identify the cell types contained in the olfactory epithelial organoids, immunostaining was performed. The results showed that olfactory epithelial organoids contain cells expressing Tuj1, which is expressed by olfactory neurons, and Sox2, which is expressed by non-neuronal cells (basal cells and supporting cells) in the olfactory epithelium. In addition, aPKC, an apical marker, was expressed inside the olfactory epithelial organoid, indicating that this organoid has apical-basal polarity. The olfactory neurons and non-neuronal cells in the organoids form a layered structure along the apical-basal axis, suggesting that the olfactory epithelial

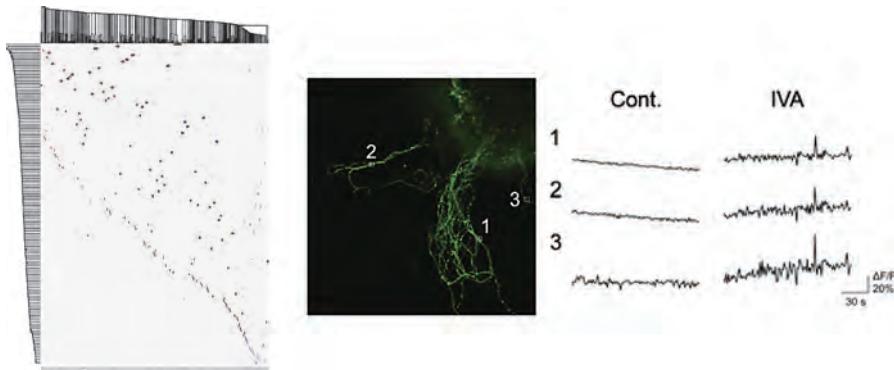


Fig2 : Mutually exclusive expression of OR genes in OSN and odor responses in olfactory epithelium organoids

organoids structurally mimic the olfactory epithelium *in vivo*.

We also performed single cell RNA sequence (scRNA-seq) to analyze the cell types and cell states of the olfactory epithelial organoids in more detail. The results showed that the olfactory epithelial organoids contain almost all cell types that constitute the olfactory epithelium *in vivo*. About half of the olfactory neurons in the organoids expressed only one type of olfactory receptor, as *in vivo*, and these olfactory neurons were found to be mature, as they showed calcium responses to odorants (Fig. 2). These results suggest that olfactory epithelial organoids can be used as a tool to analyze the developmental mechanisms of the olfactory nervous system.

List of Publications

List of Presentations

Eiraku M. Functional 3D tissue formation by *in vitro* manipulation and cell autonomy. The 15th International Symposium of The Institute Network for Biomedical Sciences: Cutting Edge of Biomedical and Metabolic Sciences. Web, November 5-6, 2020

Ohgushi M. Trophoblast competence of human embryonic stem cells. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan: New Faces, New Questions and Revitalized Worlds. Web, December 2-4, 2020

永樂元次「機能的な脳組織を幹細胞から作る：現時点の到達点と今後の課題」千里ライフサイエンス新適塾「脳はおもしろい」第27回会合、豊中、2020年1月7日

永樂元次「多能性幹細胞からの機能的な神経組織構築」第93回日本内分泌学会 中堅若手の会（YEC）シンポジウム3、ウェブ開催、2020年7月20日 - 8月31日（データ公開）

大串雅俊「ES 細胞を用いたヒト発生研究」KIPS 若手高分子シンポジウム、ウェブ開催、2020年10月23日

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

システムウイルス学分野
Laboratory of Systems Virology

教 授	小柳 義夫	Prof.	Yoshio Koyanagi
講 師	アレクシス バンデンボン	Sr. Lect.	Alexis Vandenbon
助 教	志村 和也	Assist. Prof.	Kazuya Shimura
特定助教	古瀬 祐氣	Project Assist. Prof.	Yuki Furuse

本研究室では、ウイルス学ならびにその生命現象の解明を目的として研究を進めている。2020年より志村が本分野に転じた。麻生は薬学研究科博士後期課程に進学するとともに東京大学に国内留学している。小杉が薬学研究科修士課程に入学した。小柳はエイズウイルスが個体内で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始めた。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、古瀬は厚生労働省新型コロナウイルスクラスター対策班に参加し、本邦における疫学データの解析にあたっている。志村は HIV の潜伏感染に関する研究を行っている。

1) ヒト化マウスを使った HIV-1 感染細胞の特性解析（小柳）

HIV-1 血症と CD4 陽性 T 細胞数の低下を再現する動物モデルであるヒト血液幹細胞移植マウス（ヒト化マウス）に GFP 発現 HIV-1 を接種し、GFP 陽性ウイルス産生細胞の 1 細胞レベルも含めた網羅的発現遺伝子解析が可能であることを示した。GFP 陽性 CD4T 細胞をフリューダイム C1 により単一細胞化して、scRNA-Seq 解析を行い、東大佐藤佳博士が細胞毎の発現プロファイルの次元圧縮クラスタリングを行った。その結果、ウイルス産生細胞は少なくとも 9 つの亜集団に分類された。その亜集団内の HIV-1 高発現であり濾胞性 CD4 T 細胞様 (follicular CD4 T cell-like) 細胞群であるクラスター 4 では、HIV-1 と CXCL13 を明確に高発現していた。また、HIV-1 高発現のクラスター 5 と HIV-1 低発現のクラスター 7 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 common ISG の発現量が低かった。この common ISG は、公共データベース Gene Expression Omnibus (GEO) から、細胞種共通の ISG として 104 個の ISG (common ISG) と細胞種に特異的な ISG を見出した解析よりわかった。すなわち、HIV 感染によってもっとも強力に誘導される ISG のほとんどは、上記 common ISG の多くであった。一方、ヒト化マウスから回収された HIV-1 感染細胞のクラスター 5 とクラスター 7 の間で発現量が異なる遺伝子として、HIV-1 低発現のクラスター 7 では HIV-1 抑制分子である SAMHD1 の発現量が高かった。ケモカイン CXCL13 を高発現する亜集団とインターフェロン誘導遺伝子が低発現である亜集団が、個体内での HIV-1 の感染拡大に寄与している可能性を見出した。（Aso et al., Cell Reports, 2020）

2) シングルセルおよびバルク RNA-seq サンプルを使用した遺伝子発現解析（バンデンボン）

1細胞データ分析の一般的なステップでは、1細胞サブセットで発現しているが、他のサブセットでは発現していない遺伝子（つまり、特異的発現遺伝子、DEG）の抽出が重要である。singleCellHaystackと命名したDEGを予測するための新しいアプローチを開発した（Vandenbon and Diez、Nat. Comm., 2020）。既存のアプローチと比較したところ、その手法の利点は、多くの場合任意のクラスタリングに依存しないことである。人工および実際の1細胞データセットを使用して、私たちのアプローチが高精度でDEGとマーカー遺伝子を予測できること、そしてそれは高速解析であることを示した。これらの結果は、singleCellHaystackが空間的トランск립トープの分析にも優れたアプローチであることを示している（Fig. 1）。

公開されている大量遺伝子発現データセットの解析により、遺伝子機能とその調節メカニズムが計算予測から解明できる可能性が大きい。しかしながら、これらのデータセットから多岐にわたる生物学情報を抽出する手法は未だ開発されていない。そこで、遺伝子が共発現するネットワークを推測するための50の異なるデータ処理ワークフローの系統解析を行った。これらのワークフローを、68のヒトおよび76のマウス細胞種と組織を包括する8,796および12,114のRNA-seqデータに適用した。適切なデータ正規化とバッチ効果補正アプローチの選択により、遺伝子の共発現ネットワークの品質が大幅に向上した。

他の共同研究プロジェクトとして、1細胞データを使用して、造血および免疫応答の調節メカニズムを解析している。また、自然リンパ球におけるRegnase-1（Nakatsuka et al., European Respiratory Journal 2020）およびマクロファージにおけるVEGFシグナル伝達の調節におけるSt18（Maruyama et al., Cell Reports 2020）の役割を解析した。

3) 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）

ウイルス感染症の実態を、主に疫学および公衆衛生学的な観点から新興感染症を含めて理解するための研究活動を行った。昨年度末に発生した新型コロナウイルス感染症は、本年度に入り日本でも流行が拡大した。古瀬は厚生労働省クラスター対策班の一員として、疫学データ解析およびその結果にもとづくリスク評価について提言を行ってきた。解析結果のいくつかは9篇の学術論文として発表することができ、主な内容として日本における流行の地理的/時間的な拡大の様子や重症化に係る人口統計情報（Furuse et al., Jpn J Infect Dis, 2020）、クラスターが医療施設や飲食店で多発しており、比較的若い無症状の人がクラスター形成のきっかけとなりうることの発見（Furuse et al., Emerg Infect Dis, 2020）、人が集まるときに感染者が紛れ込む統計モデルの確立（Furuse, J Infect, 2020）などがある。

また、2019年に発生したナイジェリアでのラッサ熱流行の疫学情報を解析し（Ipadeola et al., J Infect, 2020）、資源の限られた状況において緊急事態をどのように判断するべきかをまとめた（Ipadeola et al., J Glob Health, 2020）。新型コロナウイルス感染症の発生前より続けていたそのほかの研究として、さまざまな呼吸器ウイルスがもつ公衆衛生的なインパクトについて、フィリピンの家庭から高次医療機関までを包括的に調査する前向きフィールド研究で得られた1万8千症例のデータ解析を行った。その結果、RSウイルスが多大な疾病負荷をもつことや、ライノウイルスの重大

な病因性を明らかにすことができた (Furuse et al., Clin Microbiol Infect, 2020)。

4) HIV-1 潜伏感染の維持 / 再活性化に関する分子機序の解析 (志村)

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、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、潜伏感染状態の維持および再活性化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明らかとなっているが、我々の解析により、これまで報告されていないプロモドメインタンパク質も潜伏感染状態の維持に寄与していることが明らかになった。詳細な解析の結果、エピジェネティックな要因が関係していることがわかつてきた。また、shRNA スクリーニングにより、転写伸長阻害因子である DSIF/NELF の再活性化における役割の解析も進めている。

In our laboratory, we are conducting research for the purpose of elucidating Virological and Immunological phenomena. Shimura has been enrolled in our lab. Kosugi enrolled in the master's program at the Graduate School of Pharmaceutical Sciences. Koyanagi is conducting research to clarify how HIV-1 establishes the infection. Vandenbon developed an informatics analysis method for single cell RNA-seq (scRNA-Seq) analysis, and Furuse is involved in the COVID-19 cluster countermeasure group of the Ministry of Health, Labor and Welfare to analyze epidemiological data of SARS-CoV-2 infection in Japan.

1) Characteristic analysis of HIV-1-infected cells in humanized mice (Koyanagi)

We carried out omics analysis of HIV-1-infected cells including single-cell RNA-seq level from hematopoietic stem cell-transplanted mice (humanized mice) infected with GFP-expressing HIV-1. Transcriptome analysis was extended into single-cell RNA-seq (scRNA-seq) (Koyanagi) and dimensional compression analysis of the clustering profile data was performed (Kei Sato). HIV-1-producing cells were classified into at least 9 subpopulations. Cluster 4, a group of follicular helper CD4 T cell-like (Tfh-like) cells with high HIV-1 expression, clearly highly expressed CXCL13. In cluster 5 with high HIV-1 RNA and cluster 7 with low HIV-1 RNA, common Interferon Stimulated Genes (ISG) (Aso et al. Front. Microbiol. 2019) as a group of HIV-1 target cell-specific ISG was low. On the other hand, as a gene whose expression level differs between cluster 5 and cluster 7, the level of SAMHD1, coding an HIV-1 restriction factor, was high in cluster 7. We found that the subpopulation with high level of the chemokine CXCL13 and the subpopulation with low level of the ISG may contribute to the spread of HIV-1 infection *in vivo*. (Aso et al., Cell Reports, 2020)

2) Gene expression analysis using single-cell and bulk RNA-seq samples (Vandenbon)

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 (i.e. differentially expressed genes, DEGs). We developed a new approach for

predicting DEGs, called singleCellHaystack (Vandenbon and Diez, *Nature Communications*, 2020). The key advantage of singleCellHaystack compared to existing approaches is that our approach does not rely on the (often arbitrary) clustering of cells. Using artificial and real single-cell datasets we showed that our approach can predict DEGs and marker genes with high accuracy, and that it is fast. It is also a promising approach for exploratory analysis of spatial transcriptomics data (Fig.1).

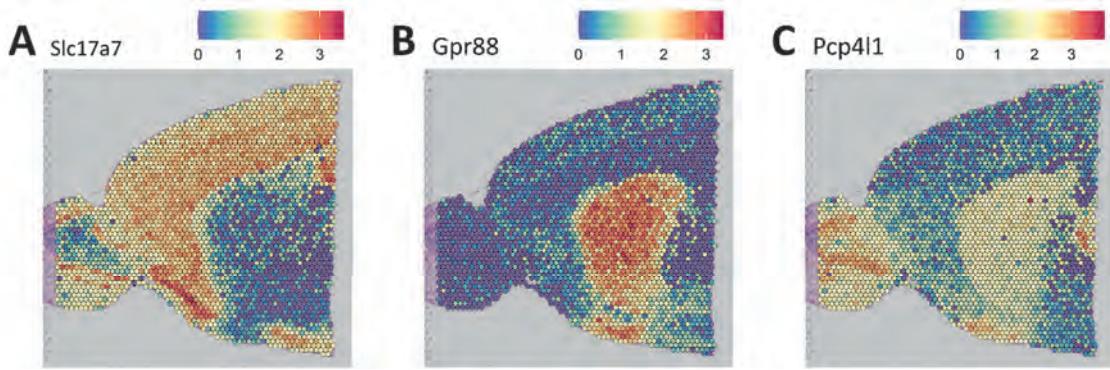


Fig. 1. Example application of singleCellHaystack for prediction of DEGs in spatial transcriptomics data of the mouse anterior brain. a–c Expression levels for 3 high-scoring DEGs predicted by our method. Each gene is expressed in different parts of the brain.

The large amounts of publicly available gene expression datasets contain a huge potential for computational prediction of gene functions and regulatory mechanisms. However, the best approaches for extracting as much biological information out of this data as possible remain unclear. We are conducting a systematic analysis of 50 different data processing workflows for inferring gene co-expression networks. We applied these workflows on 8,796 and 12,114 RNA-seq samples covering 68 human and 76 mouse cell types and tissues. We showed that the choice of suitable data normalization and batch effect correction approaches can significantly improve the quality of gene co-expression networks.

In other collaborative projects we are analyzing regulatory mechanisms in hematopoiesis and the immune response using single-cell data analysis. We also analyzed the role of Regnase-1 in innate lymphoid cells (Nakatsuka et al., *European Respiratory Journal*, 2020) and St18 in regulating VEGF signaling in macrophages (Maruyama et al., *Cell Reports*, 2020).

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

Furuse has been involved with outbreak response against COVID-19 as a member of the national task force called Cluster Response Team at the Ministry of Health, Labour and Welfare. He mainly analyzed epidemiological data and gave advice on risk assessment. Some of the work there were published in 9 academic papers. The achievements include the followings: epidemiological characteristics of COVID-19 outbreak in Japan (Furuse et al., *Jpn J Infect Dis*, 2020), investigation on cluster of COVID-19 cases in communities (Furuse et al., *Emerg Infect Dis*, 2020), and development of statistical model to calculate probability of having infectious people at mass-gathering events (Furuse, *J Infect*, 2020).

Furuse was also deployed to Nigeria for Lassa Fever outbreak response in 2019 as a WHO consultant. In collaboration with researchers at public health authorities of the country, differential in epidemiological and clinical characteristics between Lassa fever confirmed (positive for laboratory test) and suspected (test-negative) cases was revealed (Ipadeola et al., *J Infect*, 2020). Furthermore, strategies to determine emergency phase for such endemic diseases at resource-limited settings were proposed for better response in the future (Ipadeola et al., *J Glob Health*, 2020). Also, a prospective cohort study was conducted in the Philippines to elucidate the comprehensive disease burden of respiratory viral infections in children, covering from household, primary healthcare facility, to hospital. The study discovered a significant disease burden and impact of respiratory syncytial virus infections as well as a considerable etiological implication of rhinovirus infections (Furuse et al., *Clin Microbiol Infect*, 2020).

4) Molecular mechanisms of maintenance and reactivation in HIV-1 latency (Shimura)

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

List of Publications

- Kurusu, T., Kim, K. S., Koizumi, Y., Nakaoka, S., Ejima, K., Misawa, N., Koyanagi, Y., Sato, K., and Iwami, S. (2020) Quantifying the antiviral effect of APOBEC3 on HIV-1 infection in humanized mouse model. *J. Theor. Biol.* 498, 110295.
- Aso, H., Nagaoka, S., Kawakami, E., Ito, J., Islam, S., Tan, B.J.Y., Nakaoka, S., Ashizaki, K., Shiroguchi, K., Suzuki, Y., Satou, Y., Koyanagi, Y., and Sato K. (2020) Multiomics investigation revealing the characteristics of HIV-1-infected cells in vivo. *Cell Rep.* 32, 107887.
- Nakano, Y., Yamamoto, K., Takahashi-Ueda, M., Soper, A., Konno, Y., Kimura, I., Uriu, K., Kumata, R., Aso, H., Misawa, N., Nagaoka, S., Shimizu, S., Mitsumune, K., Kosugi Y., Juarez-Fernandez, G., Ito, J., Nakagawa, S., Ikeda, T., Koyanagi, Y., Harris R.S., and Sato, K. (2020) A role for gorilla APOBEC3G in shaping lentivirus evolution including transmission to humans. *PLoS Pathog.* 16, e1008812.
- Konno, Y., Kimura, I., Uriu, K., Fukushi, M., Irie, T., Koyanagi, Y., Sauter, D., Gifford, R., J., USFQ-COVID19 consortium, Nakagawa S., and Sato, K. (2020) SARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is further increased by a naturally occurring elongation variant. *Cell Rep.* 32, 108185.

- Ito J., Kimura I., Soper, A., Coudray, A., Koyanagi, Y., Nakaoka, H., Inoue, I., Turelli, P., rono D., and Sato, K. (2020) Endogenous retroviruses drive KRAB zinc-finger protein family expression for tumor suppression. **Science Advances** 6, eabc3020.
- Maruyama, K., Kidoya, H., Takemura, N., Sugisawa, E., Takeuchi, O., Kondo, T., Eid, M.M.A., Tanaka, H., Martino, M.M., Takakura, N., et al. (2020). Zinc Finger Protein St18 Protects against Septic Death by Inhibiting VEGF-A from Macrophages. **Cell Rep.** 32.
- Nakatsuka, Y., Yaku, A., Handa, T., Vandenbon, A., Hikichi, Y., Motomura, Y., Sato, A., Yoshinaga, M., Tanizawa, K., Watanabe, K., et al. (2020). Profibrotic function of pulmonary group 2 innate lymphoid cells is controlled by Regnase-1. **Eur. Respir. J.** 2000018.
- Vandenbon, A., and Diez, D. (2020). A clustering-independent method for finding differentially expressed genes in single-cell transcriptome data. **Nat. Commun.** 11, 1–10.
- Furuse, Y. (2020). Genomic sequencing effort for SARS-CoV-2 by country during the pandemic. **Int. J. Infect. Dis.** 103, 305-307.
- Furuse, Y. (2020). Risk at mass-gathering events and the usefulness of complementary events during COVID-19 pandemic. **J. Infect.** S0163-4453 (20) 30759-3.
- Furuse, Y., Tamaki, R., Suzuki, A., Kamigaki, T., Okamoto, M., Saito-Obata, M., Nakagawa, E., Saito, M., Segubre-Mercado, E., Tallo, V., Lupisan, S., and Oshitani H. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of children with acute respiratory viral infections in the Philippines: a prospective cohort study. **Clinical Microbiol. Infect.**; in press.
- Furuse, Y., and Oshitani, H. (2020). Viruses that can and cannot coexist with humans and the future of SARS-CoV-2. **Front. Microbiol.**, 11, 583252.
- Ipadeola, O., Furuse, Y., de Gooyer, T., Dan-Nwafor, C., Namara, G., Ilori, E., and Ihekweazu, C. (2020). Determination of the emergency phase for response against endemic disease outbreak: A Case of Lassa Fever Outbreak in Nigeria. **J. Global Health**, 10, 020353.
- Experts Members of The National COVID-19 Cluster Taskforce at Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (including Furuse, Y.) (2020). Cluster-based approach to coronavirus disease 2019 (COVID-19) Response in Japan-February-April 2020. **Jpn. J. Infect. Dis.** 73, 491-493.
- Furuse, Y., and Oshitani, H. (2020). Association between numbers of "Imported cases" and "reported cases in a source country" of COVID-19: January to April 2020 in Japan. **J. Infect.**, 81, e153-e154.
- Furuse, Y., Sando, E., Tsuchiya, N., Miyahara, R., Yasuda, I., Ko, Y.K., Saito, M., Morimoto, K., Imamura, T., Shobugawa, Y., Nagata, S., Jindai, K., Imamura, T., Sunagawa, T., Suzuki, M., Nishiura, H., and Oshitani, H. (2020). Clusters of coronavirus disease in communities, Japan, January-April 2020. **Emerging Infect. Dis.**, 26, 2176-9.

- Itaya, T., Furuse, Y., and Jindai, K. (2020). Does COVID-19 infection impact on the trend of seasonal Influenza infection? 11 countries and regions, from 2014 to 2020. *Int. J. Infect. Dis.*, 97, 78-80.
- Furuse, Y., Ko, Y.K., Saito, M., Shobugawa, Y., Jindai, K., Saito, T., Nishiura, H., Sunagawa, T., Suzuki, M., and Oshitani, H.; National Task Force for COVID-19 Outbreak in Japan. (2020). Epidemiology of COVID-19 outbreak in Japan, January-March 2020. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 73, 391-393.
- Ipadeola, O., Furuse, Y., Ilori, E.A., Dan-Nwafor, C.C., Akabike, K.O., Ahumibe, A., Ukponu, W., Bakare, L., Joseph, G., Saleh, M., Muwanguzi, E.N., Olayinka, A., Namara, G., Naidoo, D., Iniobong, A., Amedu, M., Ugbogulu, N., Makava, F., Adeoye, O., Uzoho, C., Anueyiagu, C., Okwor, T.J., Mba, N.G., Akano, A., Ogunniyi, A., Mohammed, A., Adeyemo, A., Ugochukwu, D.K., Agogo, E., and Ihekweazu, C. (2020). Epidemiology and case-control study of Lassa fever outbreak in Nigeria from 2018 to 2019. *J. Infect.*, 80, 583-586.

List of Presentations

Konno, Y., Uriu, K., Chikata, T., Takahashi Ueda, M., Nakagawa, S., Takiguchi, M., Morita, E., Satou, Y., Koyanagi, Y., and Sato, K. Cause and outcome of the loss of a budding motif in HIV-1 replication, pathogenesis, and spread in human population. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, virtual, May 18-23, 2020. [Poster]

小柳義夫 . 緊急シンポジウム「新型コロナウイルス感染症の対策における PCR 検査の利点と課題」、ウェブ開催 2020 年 10 月 5 日

Konno, Y., Kimura, I., Uriu, K., Fukushi, M., Irie, T., Koyanagi, Y., Nakagawa, S. and Sato, K. ARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is further increased by a naturally occurring elongation variant. Cold Spring Harbor Asia COVID19/SARS CoV2 Rapid Research Reports, virtual, November 3, 2020. [Oral (invited)]

小柳義夫 . HIV-1 ウィルス学、教育講演 . 第 34 回エイズ学会学術集会総会 , ウェブ開催 , 2020 年 11 月 27 日

佐藤佳 , 瓜生慧也 , 清水聰真 , 小杉優介 , 小柳義夫 . ウィルスと宿主の進化的攻防 : エイズウイルス vs 人類 . シンポジウム、第 34 回日本エイズ学会学術集会・総会 , ウェブ開催 , 2020 年 11 月 28 日

清水聰真 , 光宗渓杜 , Andrew Soper, 小杉優介 , 瓜生慧也 , 中野雄介 , 佐藤佳 , 小柳義夫 . HIV-1 group O 及びその祖先ゴリラウィルス Vif の抗 APOBEC3 機能解析 . 第 34 回日本エイズ学会学術集会・総会 , ウェブ開催 , 2020 年 11 月 27-12 月 25 日 [Poster]

瓜生慧也 , 清水聰真 , 小杉優介 , 小柳義夫 , 佐藤佳 . HIV-1 誕生に繋がるレンチウイルスの異種間伝播の解析 . 第 43 回日本分子生物学会年会 , オンライン開催 , 2020 年 12 月 2-4 日 [Poster]

小柳義夫. シンポジウム「新型コロナウイルス感染症について」、「コロナウイルス感染症とナノメディシン」京都大学量子ナノ医療研究センター主催、ウェブ開催 2020 年 12 月 5 日

Vandenbon, A. SingleCellHaystack: A clustering-independent method for finding differentially expressed genes in single-cell transcriptome data. Human Cell Atlas Asia Meeting 2020, China (online), 2020 年 10 月 22-23 日 .

Vandenbon, A. SingleCellHaystack: A clustering-independent method for finding differentially expressed genes in single-cell transcriptome data. Emerging Technologies in Single Cell Research, Belgium (online), 2020 年 11 月 19-20 日 .

Vandenbon, A. SingleCellHaystack: A clustering-independent method for finding differentially expressed genes in single-cell transcriptome data. 1st International Symposium of CCII - Bioinformatics and its application to cancer and other diseases, 京都 (online), 2021 年 1 月 15 日 .

Furuse Y. Viruses that can and cannot coexist with humans and the future of SARS-CoV-2. AFRICA INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY AND BIOMEDICAL CONFERENCE 2020. Web, November 2020.

古瀬祐氣 疫学データ分析の手法 COVID-19 行政担当者向けウェブセミナー、ウェブ開催、2020 年 6 月

古瀬祐氣 ウィルスと人の関わり コロナ新時代を拓く東北大学卓越大学院セミナー、ウェブ開催、2020 年 6 月

古瀬祐氣 Novel algorithm to identify beneficial genetic mutations in viral genome: Ebola, Influenza, and SARS-CoV-2 The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences 2020、ウェブ開催、2020 年 11 月

古瀬祐氣 WHO やクラスター班にも従事する、異端のウィルス研究者にねほりんばほりん ウィルス学若手研究集会、ウェブ開催、2020 年 12 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	磯村 彰宏	Assist. Prof.	Akihiro Isomura

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、分節時計遺伝子 Hes7 の発現を単一細胞レベルで可視化するシステムを開発し、Hes7 が体節形成過程で同期振動する分子機構を探った。さらに、Hes1 の発現振動を減衰させることによって神経幹細胞における Hes1 の発現振動の意義を明らかにした。

1) 分節時計遺伝子 Hes7 の同期振動のライブイメージングと分子機構

分節時計遺伝子 Hes7 の発現は未分節中胚葉細胞間で同期振動することによって、体節形成を制御する。Notch シグナル・モジュレーターである Lfng を欠損したマウスは体節癒合を引き起こすので、このとき Hes7 の発現動態がどのような影響を受けるのかを解析した。そのため、Hes7 の発現を可視化できる新たなレポーターマウス Hes7-Achilles を作製した。このマウスは、理研の宮脇研で開発された新規蛍光タンパク質 Achilles と Hes7 との融合タンパク質を Hes7 プロモーター下で発現する。Achilles は短時間で成熟して明るい蛍光を発るので、このレポーターマウスでは Hes7 の発現動態を 1 細胞レベルで解析することが可能になった。正常な未分節中胚葉では、隣接細胞間で Hes7 の発現振動はほぼ完全に同期していた（図 1 上側）。一方、Lfng (-/-) マウスでは Hes7 の発現振動は個々の細胞で減弱するとともに、隣接細胞間の同期率が著しく低下していた（図 1 下側）。しかし、Lfng (-/-) マウスの未分節中胚葉細胞を細胞間相互作用が起こらないように分散培養したところ、Hes7 の発現振動はほぼ正常であったことから、Lfng は細胞間相互作用で重要な役割を担うことが強く示唆された。Lfng (-/-) やコントロール未分節中胚葉細胞の混合培養や光遺伝学的解析から、Lfng を欠損すると Notch リガンドである Delta-like1 (Dll1) の細胞膜表面での発現が加速化すること、そのために Hes7 の発現振動が減弱して隣接細胞間での同期率が低下することが分かった。以前に、Dll1 遺伝子からイントロンを除去することによって Dll1 の発現を加速化する変異マウスを作製したところ、Hes7 の発現振動が減弱して体節が癒合することを報告していたが、その結果

とも非常に良く一致していた。また、数理モデルの予測からも、Notch シグナルによる細胞間の情報伝達速度が同期振動に必須な役割を担うことが示された。以上から、Lfng は Dll1 の細胞膜表面での発現のタイミングを調節することによって Hes7 の同期振動を制御することが明らかになった。

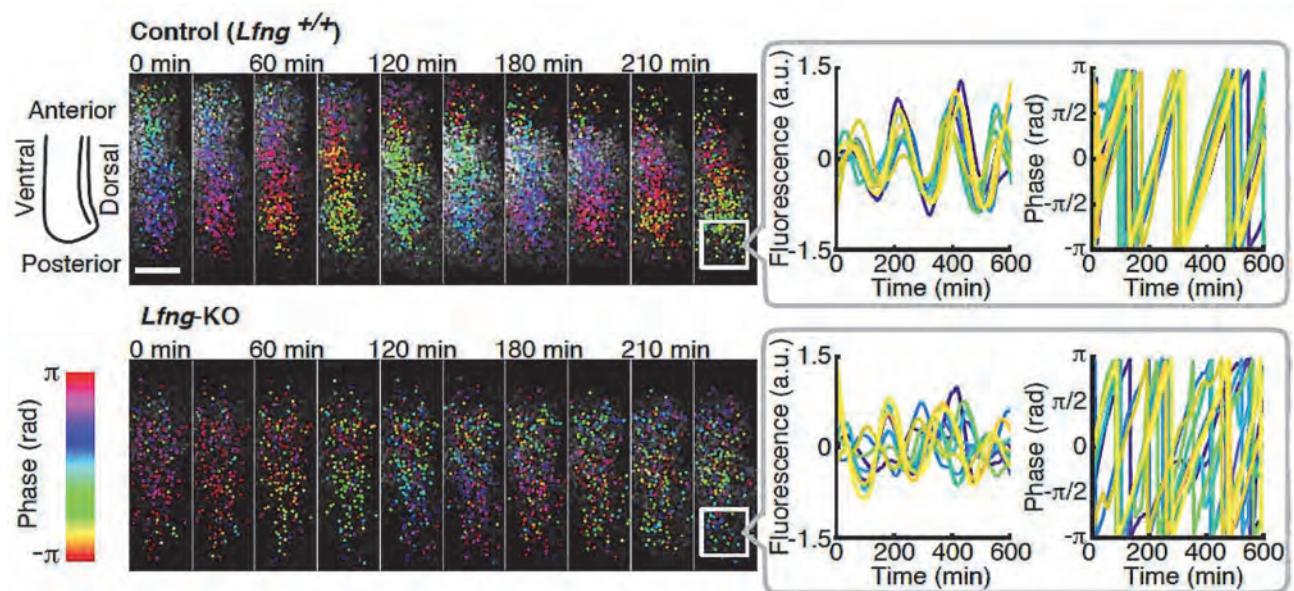


Fig. 1. Live-imaging of Hes7 expression in the presomitic mesoderm. Hes7 expression oscillates in phase in the wild type (upper), but Hes7 oscillations are dampened and become out of synchrony in the absence of *Lfng* (lower).

2) 神経幹細胞における Hes1 の発現振動の役割

神経幹細胞では Hes1 や Hes5 の発現が約 2 時間周期で振動するが、その意義についてはよくわかつていなかった。そこで、Hes1 遺伝子からイントロンを除去した変異マウス (Hes1 intron (-)) を作製したところ (図 2A)、Hes1 の発現が加速化して振動が減弱し、定常発現に近付いた (図 2B)。したがって、Hes1 の発現振動もスプライシングを介した遅いタイミングのネガティブフィードバックに依存することが分かった。しかし、この変異マウスは全体的にサイズが少し小さくなるが、神経発生過程に大きな異常は見られなかった。Hes1 の発現振動の減弱の影響は Hes3 や Hes5 によって代償されることが示唆されたので、Hes3 (-/-);Hes5 (-/-) マウスにおける Hes1 intron (-) の効果を調べた。Hes3 (-/-);Hes5 (-/-) マウスはほぼ正常であるが、ここに Hes1 intron (-) 変異を導入すると、神経幹細胞の増殖や分化能に異常が見られ、小頭症になった (図 2C)。以上から、Hes1 の発現振動は正常な神経発生に必須であることが明らかになった。

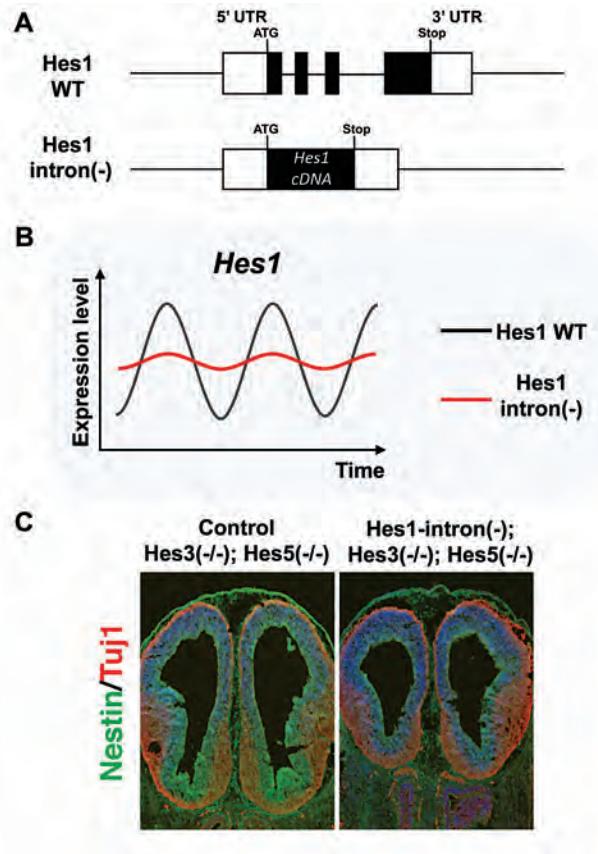


Fig. 2. The significance of Hes1 oscillation in neural development.

- (A) Schematic structure of wild-type Hes1 and Hes1 intron(-) genes.
- (B) Hes1 oscillation in neural stem cells. Hes1 oscillation is robust in wild-type neural stem cells but becomes dampened in Hes1 intron (-) neural stem cells.
- (C) Brain structures of Hes3(-/-);Hes5(-/-) mice and Hes1 intron (-);Hes3(-/-);Hes5(-/-) mice.

We found that gene expression oscillates with a period of about 2-3 h in many biological events and try to elucidate the significance and mechanism of such oscillatory gene expression. Particularly, we have been focusing on neurogenesis and somitogenesis. The expression of the basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factors Hes1, Hes5 and Hes7 oscillates autonomously by negative feedback, and these oscillations drive oscillatory expression of the downstream genes. Recent studies revealed the mechanism of synchronous Hes7 oscillations in the segmentation clock and the significance of Hes1 oscillations in neural stem cells.

1) Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock

Individual cellular activities fluctuate, yet are constantly coordinated at the population level via cell-cell coupling. A notable example is the somite segmentation clock, in which the expression of clock genes, such as *Hes7*, oscillates in synchrony between cells comprising the presomitic mesoderm (PSM). This synchronization depends on the Notch signaling pathway, and inhibiting this pathway desynchronizes oscillations, leading to somite fusion. However, how Notch signaling regulates HES7 oscillation synchrony is unknown. Here, we established a live-imaging system using a new fluorescent reporter (*Hes7-Achilles*) to monitor synchronous HES7 oscillations in the mouse PSM at single-cell resolution. Wild-type cells can rapidly correct for phase fluctuations in HES7 oscillations, whereas absence of the Notch modulator *Lunatic fringe* (*Lfng*) leads to loss of PSM cell synchrony. Furthermore, HES7 oscillations are severely dampened in

individual cells of *Lfng*-null PSM. However, when *Lfng*-null PSM cells were completely dissociated, HES7 oscillations showed almost normal amplitudes and periodicity, suggesting that LFNG is mostly involved in cell-cell coupling. Mixed cultures of control and *Lfng*-null PSM cells and optogenetic Notch signaling reporter assay revealed that LFNG delays the signal-sending process of intercellular Notch signaling transmission. These results together with mathematical modeling raised the possibility that *Lfng*-null PSM cells shorten the coupling delay, thereby approaching a condition known as the oscillation/amplitude death of coupled oscillators. Indeed, a small compound, which lengthens the coupling delay, partially rescues the amplitude and synchrony of HES7 oscillations in *Lfng*-null PSM cells. Thus, our study reveals a delay control mechanism of the oscillatory networks involved in somite segmentation, and indicates that intercellular coupling with a proper delay is essential for the synchronized oscillations.

2) Oscillatory expression of Hes1 regulates cell proliferation and neuronal differentiation in the embryonic brain

The expression of the transcriptional repressor Hes1 oscillates in many cell types, including neural progenitor cells (NPCs), but the significance of Hes1 oscillations in development is not fully understood. To examine the effect of altered oscillatory dynamics of Hes1, we generated two types of *Hes1* knock-in mice, a shortened (type-1) and an elongated (type-2) *Hes1* gene, and examined their phenotypes focusing on neural development. While both mutations affected Hes1 oscillations, the type-1 mutation damped Hes1 oscillations more severely, resulting in much lower amplitudes. The average levels of Hes1 expression in type-1-mutant NPCs were also lower than in wild-type NPCs but similar to or slightly higher than those in *Hes1* heterozygous mutant mice, which exhibit no apparent defects. While type-2-mutant mice were apparently normal, type-1-mutant mice displayed smaller brains than wild-type mice and up-regulated proneural gene expression. Furthermore, proliferation of NPCs decreased and cell death increased in type-1-mutant embryos. When *Hes3* and *Hes5* were additionally deleted, neuronal differentiation was also accelerated, leading to microcephaly. Thus, robust Hes1 oscillations are required for maintenance and proliferation of NPCs and the normal timing of neurogenesis, thereby regulating brain morphogenesis.

List of Publications

- Takagi, A., Isomura, A., Yoshioka-Kobayashi, K., and Kageyama, R. (2020). Dynamic Delta-like1 expression in presomitic mesoderm cells during somite segmentation. **Gene Expression Patterns** 35, 119094.
- Sueda, R., and Kageyama, R. (2020). Regulation of active and quiescent somatic stem cells by Notch signaling. **Dev. Growth Diff.** 62, 59-66.
- Yoshioka-Kobayashi, K., Matsumiya, M., Niino, Y., Isomura, A., Kori, H., Miyawaki, A., and Kageyama, R. (2020). Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock. **Nature** 580, 119-123.

- Diaz-Cuadros, M., Wagner, D.E., Budjan, C., Hubaud, A., Touboul, J., Michaut, A., Tanoury, Z.A., Yoshioka-Kobayashi, K., Niino, Y., Kageyama, R., Miyawaki, A., and Pourquié, O. (2020). *In vitro* characterization of the human segmentation clock. **Nature** 580, 113-118.
- Sakamoto, S., Tateya, T., Omori, K., and Kageyama, R. (2020). Id genes are required for morphogenesis and cellular patterning in the developing mammalian cochlea. **Dev. Biol.** 460, 164-175.
- Okunomiya, T., Hioki, H., Nishimura, C., Yawata, S., Imayoshi, I., Kageyama, R., Takahashi, R., and Watanabe, D. (2020). Generation of a MOR-CreER knock-in mouse line to study cells and neural circuits involved in mu opioid receptor signaling. **Genesis**, 58, e23341.
- Bosze, B., Moon, M.-S., Kageyama, R., Brown, N.L. (2020). Simultaneous requirements for *Hes1* in retinal neurogenesis and Optic Cup-Stalk Boundary Maintenance. **J. Neurosci.** 40, 1501-1513.
- Seymour, P.A., Collin, C.A., Egeskov-Madsen, A.R., Jørgensen, M.C., Shimojo, H., Imayoshi, I., de Lichtenberg, K.H., Kopan, R., Kageyama, R., and Serup, P. (2020). Jag1 modulates an oscillatory Dll1-Notch-Hes1 signaling module to coordinate growth and fate of pancreatic progenitors. **Dev. Cell** 52, 731-747.
- Ochi, S., Imaizumi, Y., Shimojo, H., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2020). Oscillatory expression of Hes1 regulates cell proliferation and neuronal differentiation in the embryonic brain. **Development** 147, dev182204.
- Imayoshi, I., Tabuchi, S., Matsumoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., Kageyama, R., and Yamanaka, A. (2020). Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in and BAC transgenic mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR3. **Sci. Rep.** 10, 3191.
- Fustin, J.-M., Ye, S., Rakers, C., Kaneko, K., Fukumoto, K., Yamano, M., Versteven, M., Grünwald, E., Cargill, S.J., Tamai, T.K., Xu, Y., Jabbur, M.L., Kojima, R., Lamberti, M.L., Yoshioka-Kobayashi, K., Whitmore, D., Tammam, S., Howell, L., Kageyama, R., Matsuo, T., Stanewsky, R., Golombek, D.A., Johnson, C.H., Kakeya, H., van Ooijen, G., and Okamura, H. (2020). Methylation deficiency disrupts biological rhythms from bacteria to humans. **Commun. Biol.** 3, 211.
- Glaser, T., Shimojo, H., Ribeiro, D.E., Martins, P.P.L., Beco, R.P., Kosinski, M., Sampaio, V.F.A., Corrêa-Velloso, J., Oliveira, A., Lameu, C., de Jesus Santos, A.P., de Souza, H.D.N., Teng, Y.D., Kageyama, R., and Ulrich, H. (2020). ATP and spontaneous calcium oscillation control neural stem cell fate determination in Huntington's disease: a novel approach for cell clock research. **Mol. Psychiatry**, in press.
- Yahiro, Y., Maeda, S., Morikawa, M., Koinuma, D., Jokoji, G., Ijuin, T., Komiya, S., Kageyama, R., Miyazono, K., and Taniguchi, N. (2020). BMP-induced Atoh8 attenuates osteoclastogenesis by suppressing Runx2 transcriptional activity and reducing the Rankl/Opg expression ratio in osteoblasts. **Bone Res.** 8, 32.

Kobayashi, T., and Kageyama, R. (2020). Lysosomes and signaling pathways for maintenance of quiescence in adult neural stem cells. **FEBS J.**, in press.

Matsuda, M., Hayashi, H., Garcia-Ojalvo, J., Yoshioka-Kobayashi, K., Kageyama, R., Yamanaka, Y., Ikeya, M., Toguchida, J., Alev, C., and Ebisuya, M. (2020). Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds. **Science**, 369, 1450-1455.

Yoshioka-Kobayashi, K., and Kageyama, R. (2020). Imaging and manipulating the segmentation clock. **Cell. Mol. Life Sci.**, in press.

Kageyama, R., Ochi, S., Sueda, R., and Shimojo, H. (2020). The significance of gene expression dynamics in neural stem cell regulation. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B** 96, 351-363.

Matsumori, T., Kodama, Y., Takai, A., Shiokawa, M., Nishikawa, Y., Matsumoto, T., Takeda, H., Marui, S., Okada, H., Hirano, T., Kuwada, T., Sogabe, Y., Kakiuchi, N., Tomono, T., Mima, A., Morita, T., Ueda, T., Tsuda, M., Yamauchi, Y., Kuriyama, K., Sakuma, Y., Ota, Y., Maruno, T., Uza, N., Marusawa, H., Kageyama, R., Chiba, T., and Seno, H. (2020). *Hes1* is essential in proliferating ductal cell-mediated development of intrahepatic cholangiocarcinoma. **Cancer Res.** 80, 5305-5316.

Anderson, M.J., Magidson, V., Kageyama, R., and Lewandoski, M. (2020). *Fgf4* maintains *Hes7* levels critical for normal somite segmentation clock function. **Elife** 9, e55608.

末田梨沙、影山龍一郎 (2020). 神経幹細胞の休眠化・活性化機構 –Ascl1・Hes1による制御. 医学のあゆみ 273, 20822-20823.

List of Presentations

Kageyama R. The mechanism of the somite segmentation clock. JSPS Core-to-Core Program “Establishing International Research Network of Mathematical Oncology”, Osaka, October 26-28, 2020.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. RIKEN BDR-CuSTOM Joint Symposium, Kobe, November 4-6, 2020.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. The Company of Biologists Workshop “Cell State Transitions: Approaches, Experimental Systems and Models”, UK, December 14-18, 2020.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control of active versus quiescent neural stem cells. RIKEN CBS Seminar, Wako, November 30, 2020.

小林妙子 . Lysosomal regulation of quiescence and proliferation in neural stem cells. German-Japanese Developmental Neuroscience Meeting 2020, 京都 , 2020 年 1 月 13 日 .

小林妙子 . Lysosomal regulation of proliferation and quiescence in neural stem cells. 第 16 回 成体脳ニューロン新生懇談会・「個性」創発脳共催研究会 (Adult Neurogenesis Meeting in Sendai 2020). 仙台 , 2020 年 2 月 21 日 .

Shomojo H, Kageyama R. Gene expression dynamics regulate the timing of down-regulation of Notch signaling and neuronal differentiation. 第43回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019年12月2-4日.

小林妙子. Lysosomal regulation of quiescence in neural stem cells. 第43回日本分子生物学会大会, オンライン, 2020年12月4日.

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

RNA システム分野
Laboratory of RNA System

教 授	大野 瞳人	Prof.	Mutsuhito Ohno
助 教	北畠 真	Assist. Prof.	Makoto Kitabatake
助 教	谷口 一郎	Assist. Prof.	Ichiro Taniguchi

細胞の中の RNA の大部分は裸ではなくタンパク質との複合体 (RNP) として存在し機能する。当分野は、RNP の形成・構造変換・輸送・解体・品質管理など、RNP をめぐる様々な現象に興味を持って研究している。本年度は以下のような成果が得られた。

1) ISG20 と核の RNA エクソソームは U snRNA と U1 variant の新生転写産物を分解する

真核生物中に複数種存在する U snRNP の適切な機能は、mRNA 前駆体のスプライシング反応に必須である。したがって、U snRNP の成熟過程、および品質管理機構についての正しい知識は、真核生物の遺伝子発現機構のより深い理解に繋がるだろう。本研究は、ヒト U snRNP 成熟過程の一つである「U snRNA 前駆体の 3' 末端の成熟」を行う因子（以下、Trimmer）の同定を当初の目的とした。その手始めとして 3' 末端の成熟の試験管内反応系を構築し、その反応が、唯一の Trimmer の報告例である TOE1 に依存したものかを評価した。その結果、活性の一部は TOE1 に依存しておらず、少なくとも試験管内で Trimmer として機能できる因子が TOE1 以外にも存在することが示唆された。そこで、この試験管内の活性を司るタンパク質を生化学的手法により精製した。その結果、Trimmer の候補タンパク質として、ISG20 および、EXO10 を含む RNA exosome 複合体を獲得した。しかしながら、各因子のノックダウン条件下のヒト培養細胞において、U1 snRNA の 3' 末端形成への影響は認められず、これらの候補因子を Trimmer と結論する結果は得られなかった。しかしながら、さらなる研究によって、U snRNA と、通常分解されると考えられる U1 variant の各新生鎖が、候補因子のノックダウンにより顕著に蓄積することが明らかになった。これらの結果は、ISG20 や EXO10、および EXO10 を含む RNA exosome 複合体が、3' 末端の成熟ではなく、異常な U snRNA が生成してしまったときにそれらを分解して、RNA の品質管理を行う因子であることを示唆した。本研究では当初の目的は達成できなかったが、U snRNA の生合成に関わると考えられる新規因子の同定に成功した。この成果は Genes to Cells 誌に発表した。

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

化学物質や紫外線により DNA に損傷を受けた細胞は、速やかに DNA 損傷チェックポイント機構が働き、損傷した DNA が修復される一方で、修復できない場合にはアポトーシスにより排除される。近年、この DNA 損傷応答にいくつかの RNA 結合タンパク質が関与し、重要な役割を担ってい

ることが報告されている。当研究室では、これまでに核内で転写された RNA に形成される RNA 核外輸送複合体に着目し、RNA 輸送因子である PHAX が、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ことを明らかにしてきた。しかしながら、RNA の輸送以外の現象に PHAX が関わるかは未解明であった。

本研究では、PHAX が、ヒストン H2AX mRNA の転写、及び、核外輸送制御を介して、DNA 損傷応答に関わることを明らかにした (Fig.1)。PHAX をノックダウンした細胞を UV 照射したところ、DNA 損傷応答の阻害、生存率の低下が見られた。詳細に解析したところ、DNA 損傷応答に関わるリン酸化 histone H2AX の発現に、PHAX が必要であることが明らかになった。また、PHAX は histone H2AX mRNA の転写・核外輸送を制御することで、DNA 損傷時のリン酸化 histone H2AX の発現に関わっていた。この成果は、RNA 誌に発表した。

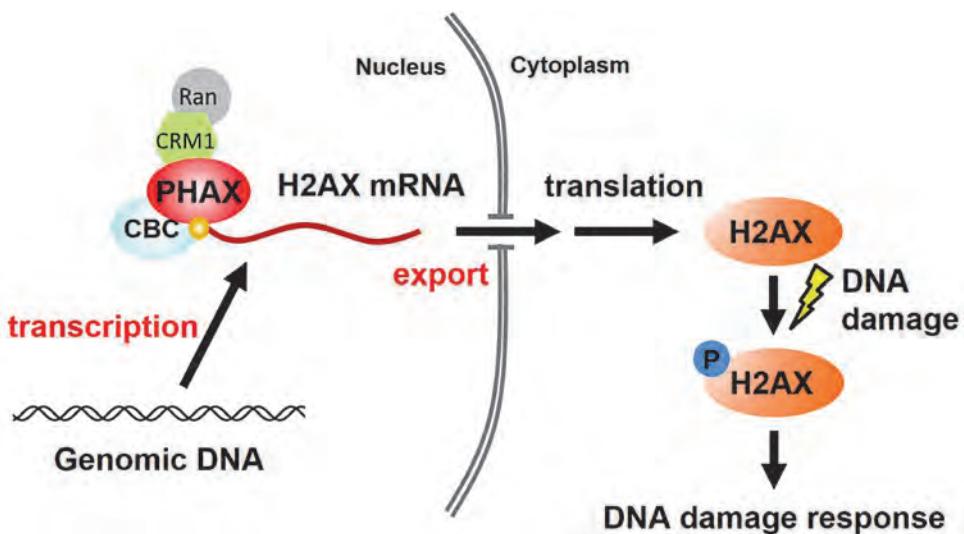


Fig.1. RNA transport factor PHAX promotes DNA damage response via regulation of histone H2AX expression

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。本年度は E3 複合体のリコンビナント精製を行うとともに Bec1 結合タンパク質の網羅的探索を行い、Bec1 が働く仕組みについて詳細な解析を行った。

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) ISG20 and nuclear exosome promote destabilization of nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs and U1 variants

Primary RNA transcripts are processed in a plethora of ways to become mature functional forms. In one example, human spliceosomal U snRNAs are matured at their 3'-end by an exonuclease termed TOE1. This process is important since mutations in *TOE1 gene* can cause a human genetic disease, pontocerebellar hypoplasia (PCH). Nevertheless, TOE1 may not be the only maturation exonuclease for U snRNAs in the cell. Here we biochemically identify two exonucleolytic factors, Interferon-stimulated gene 20-kDa protein (ISG20) and the nuclear exosome as such candidates, using a newly developed *in vitro* system that recapitulates 3'-end maturation of U1 snRNA. However, extensive 3'-end sequencing of endogenous U1 snRNA of the knock-down (KD) cells revealed that these factors are not the maturation factors *per se*. Instead, the nascent transcripts of the spliceosomal U snRNAs as well as of unstable U1 variants were found to increase in quantity upon KD of the factors. These results indicated that ISG20 and the nuclear exosome promote the degradation of nascent spliceosomal U snRNAs and U1 variants, and therefore implied their role in the quality control of newly synthesized U snRNAs.

2) RNA transport factor PHAX promotes 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 (γ 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 γ 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., McCloskey, A., Suzuki, T. and Ohno, M. (2020).

The RNA transport factor PHAX is required for proper histone H2AX expression and DNA damage response. *RNA* 26:1716–1725.

Takahito Kawamoto, T., Yoshimoto, R., Taniguchi, I., Kitabatake, M. and Ohno, M. (2020)

ISG20 and nuclear exosome promote destabilization of nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs and U1 variants. *Genes. Cells.* First published: 04 November 2020 <https://doi.org/10.1111/gtc.12817>

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。2020年は、大腸菌細外膜のリポ多糖（LPS）トランスロコンサブユニットLptDの合成と品質管理に関わるBepAタンパク質の活性制御機構を明らかにしました。また、ビブリオ菌で細胞のタンパク質膜透過能をモニターし、自身の翻訳停止（アレスト）を介してSecDF2複合体タンパク質の発現制御に働くVemPの、種々の膜透過関連因子との相互作用や機能部位について報告し、VemPの翻訳アレスト解除機構のモデルを提唱しました。

1) 大腸菌プロテアーゼBepAのタンパク質分解活性制御機構の解析

大腸菌の β -バレル型外膜タンパク質LptDは、LPSの外膜への挿入を担うLPSトランスロコン（LptD/E）の主要なサブユニットである。ペリプラズムタンパク質BepAは、LptDの外膜へのアセンブリを促進する（分子シャペロン様機能）と共に、アセンブリが阻害された場合はLptDを分解除去する（プロテアーゼ機能）ことで、外膜の構造・機能の維持に働く二機能性タンパク質である。しかし、これまでBepAの機能がどのように制御されているかは明らかにされていなかった。最近我々が明らかにしたBepAの結晶構造から、第9ヘリックス（ α 9）を含むループの中にある246番目のヒスチジン残基（His-246）が活性中心の Zn^{2+} イオンに配位し、基質の分解に必要な水分子の結合を妨げていることが示唆された（Fig.1）。このループ（ α 9/H246ループ）及びHis-246の機能を明らかにするために、ループの欠失あるいはHis-246の他のアミノ酸へ置換体を作成し、その機能を調べたところ、これらのBepA変異体は、正常なアセンブリ途上にあるLptDも分解することが分かった。また、精製BepAによるカゼインの分解活性の測定により、これらの変異体ではプロテアーゼ活性が上昇していることを確認した。反対に、ジスルフィド結合を導入すること

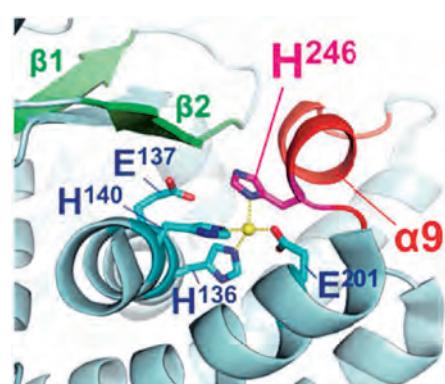


Fig. 1. Proteolytic active site of BepA
Zinc atom(yellow), catalytic residues (cyan) and His-246 (magenta) are indicated.

で α 9/H246 ループを固定すると、LptD の分解は抑制された。これらの結果から、BepA の α 9/H246 ループは、プロテアーゼ活性の発現を抑制しているが、このループの可逆的な構造変化により H246 残基が活性部位の Zn²⁺ イオンからはずれることで、BepA のプロテアーゼ活性が発現されるものと考えられる。すなわち、BepA のプロテアーゼ機能は上記の様な ON/OFF に関わるスイッチ（“ヒストジンスイッチ”）により制御されていると推測される。

2) ビブリオ属細菌の膜透過モニター因子 VemP の翻訳伸長停止の解除機構

VemP は、ビブリオ属細菌が持つ分泌タンパク質で、Sec 膜透過装置により駆動されるタンパク質の分泌活性をモニターする役割を持つ。VemP は自身の C 末端近傍に特異的な翻訳停止配列を有している。細胞の分泌活性が低下した時にこの配列とリボソームトンネル内壁との相互作用を介して VemP の翻訳伸長反応は安定に停止し、結果として下流遺伝子 secD/F（膜透過促進因子をコードする）の発現を誘導する。VemP の翻訳停止は、通常の生育条件下でも一過的に起こるが、Sec トランスロコン上での、自身の膜透過に伴う引っ張り力によって迅速に解除されると考えられている。しかし、トランスロコンへの標的化経路を含めて、VemP 翻訳停止の解除機構は不明な点が多く残されていた。

VemP 翻訳停止の解除機構を明らかにするために、VemP を対象として系統的な *in vivo* 光架橋解析を行なったところ、相互作用が予想されたリボソームや Sec トランスロコンの構成因子に加えて、シグナル認識粒子 (SRP) や内膜に局在するシャペロンである PpiD が翻訳停止状態の VemP と相互作用することを見出し、遺伝学的な解析から SRP と PpiD が VemP の翻訳停止解除に重要であることを明らかにした。我々が最近開発した PiXie (pulse-chase and *in vivo* photo-cross-linking experiment) 法を用いて、架橋産物の消失速度と VemP 翻訳停止解除の速度を詳細に比較することにより、VemP の成熟過程で生じる各因子との相互作用の順序を決定した。その結果、翻訳停止した VemP は SRP によって膜上の Sec トランスロコンへと輸送され、その後 PpiD と相互作用することを強く示唆した。加えて、PpiD が SecD/F 複合体と直接相互作用し、VemP の翻訳停止解除に協同的に働くことも示した。さらに、VemP の保存された Arg-85 残基が、PpiD/SecDF 依存性を付与する必須の *cis* エレメントであり、翻訳停止解除に重要な役割を持つことも示した。以上の結果から、膜透過の後期過程を特異的にモニターするのに適した VemP の翻訳停止解除のモデルを提唱した (Fig. 2)。

本年は、理学研究科修士課程大学院生として古味大雄さんと中込悠輔さんが、新たに研究室に加わりました。

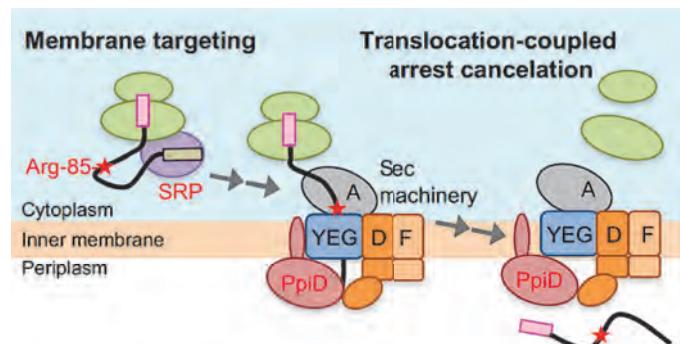


Fig. 2. A model of the arrest cancelation of a VemP-nascent polypeptide

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 2020, we revealed the mechanism of the proteolytic activity switching of *E. coli* BepA, a periplasmic protein involved in biogenesis and quality control of LptD, a central subunit of LPS translocon. We also investigated the fine interaction profile and a functionally-important cis element of VemP, a *Vibrio* secretion monitor protein that regulates the expression of the genes (*secDF2*) involved in protein secretion through its translational arrest, and proposed a model of the arrest-cancelation processes of VemP.

1) Elucidation of the regulatory mechanism for the protease activity of *Escherichia coli* protease BepA

Escherichia coli periplasmic protease BepA is a dual functional protein involved in the assembly of LptD, a β-barrel outer membrane protein required for the biogenesis of lipopolysaccharides. BepA possesses both chaperone-like activity (promotion of LptD maturation) and protease activity (degradation of misassembled LptD). The regulatory mechanism of the BepA's functions, however, remains to be elucidated. The recently-solved BepA structure showed that the His-246 residue (H246) in the loop region containing helix α9 (α9/H246 loop) coordinates the zinc ion as the fourth ligand to exclude a catalytic water molecule. BepA mutants with an H246 mutation or a deletion of the α9/H246 loop exhibited an elevated protease activity *in vitro* and degraded LptD on the normal assembly pathway *in vivo*. In contrast, disulfide bond-mediated tethering of the α9/H246 loop repressed the LptD degradation. These results suggest that the protease activity of BepA is usually inhibited by His-246, but expressed when His-246 is dissociated from the active site zinc ion as a result of the movement of the α9/H246 loop. We propose that the protease activity of BepA is reversibly regulated by structural change of the α9/H246 loop that enables the His-246-mediated switching (histidine switch).

2) Mechanism for translation arrest–cancelation of *Vibrio* secretion monitor VemP

VemP (*Vibrio* protein export monitoring polypeptide) is a secretory polypeptide that plays a central role in monitoring cellular abilities of protein export mediated by the Sec translocation machinery in *Vibrio* species. VemP has a unique translation arrest sequence near its C-terminus. When protein export of a cell is compromised, translation of VemP is stably arrested via specific interactions between the arrest motif and interior regions of the ribosome exit tunnel, resulting in up-regulation of its downstream genes *secD/F*, whose products facilitate the protein export. It has been suggested that, although VemP translation arrest occurs transiently even under a normal protein export condition, it is rapidly canceled on the Sec translocon by an export-coupled pulling force. However, it remains largely unclear how the arrested-VemP is targeted to, and the translation arrest is canceled on the translocon.

To clarify the mechanism of the VemP-arrest cancelation, we performed systematic *in vivo* photo-cross-

linking analyses targeted to the entire region of VemP and found that the arrested-VemP interacts with SRP (signal recognition particle) and PpiD (a membrane-anchored periplasmic chaperone) as well as expected factors including components of the translocon and a ribosomal protein. Our genetic analyses showed that SRP and PpiD are crucial for the VemP-arrest cancelation. A detailed comparison between the disappearance rates of the crosslinked products and the rate of the VemP-arrest cancelation using a recently-developed PiXie (pulse-chase and *in vivo* photo-cross-linking experiment) method allowed us to determine the order of the interactions of the arrested-VemP with these cellular factors during its maturation processes. These results strongly suggest that the arrested-VemP is first targeted by SRP to the Sec translocon and then interacts with PpiD. Further, we showed that PpiD directly interacts and cooperates with SecD/F for canceling the translation arrest of VemP. Finally, we demonstrated that the conserved Arg-85 residue of VemP is a crucial *cis*-element that confers the PpiD-SecD/F dependence to VemP and plays an essential role in the regulated arrest-cancelation. Based on these results, we proposed a scheme of the arrest-cancelation processes of VemP, which likely monitors late steps in the protein translocation pathway.

List of Publications

- Miyazaki, R., Akiyama, Y., and Mori, H. (2020). Fine interaction profiling of VemP and mechanisms responsible for its translocation-coupled arrest-cancelation. **eLife**, 9, e62623.
- Miyake, T., Hizukuri, Y., and Akiyama, Y. (2020). Involvement of a membrane-bound amphiphilic helix in substrate discrimination and binding by an *Escherichia coli* S2P peptidase RseP. **Front. Microbiol.** 11, 607381.
- Daimon, Y., Narita, S., Miyazaki, R., Hizukuri, Y., Mori, H., Tanaka, Y., Tsukazaki, T., and Akiyama, Y. (2020). Reversible auto-inhibitory regulation of *Escherichia coli* metallopeptidase BepA for selective β -barrel protein degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 117, 27989-27996.
- Miyazaki, R., Akiyama, Y., and Mori, H. (2020). A photo-cross-linking approach to monitor protein dynamics in living cells. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.** 1864, 129317.
- Miyata, M., Robinson, R. C., Uyeda, T. Q. P., Fukumori, Y., Fukushima, S., Haruta, S., Homma, M., Inaba, K., Ito, M., Kaito, C., Kato, K., Kenri, T., Kinoshita, Y., Kojima, S., Minamino, T., Mori, H., Nakamura, S., Nakane, D., Nakayama, K., Nishiyama, M., Shibata, S., Shimabukuro, K., Tamakoshi, M., Taoka, A., Tashiro, Y., Tulum, I., Wada, H. and Wakabayashi, K. (2020). Tree of motility - A proposed history of motility systems in the tree of life. **Genes Cells** 25, 6-21.
- 宮崎亮次、森博幸、秋山芳展 (2021). PiXie 法による細胞内タンパク質の迅速な相互作用・フォールディング解析. **生物物理** 61, 036-039.

List of Presentations

- 石井英治、秋山芳展、森 博幸 新生ポリペプチド鎖依存的な膜局在化による mRNA 分解促進 日本農芸化学会 2020 年度大会、福岡、2020 年 3 月 25–28 日
- 檜作洋平、横山 達彦、秋山芳展 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP を介した TA system の制御：細胞休眠・覚醒における意義 第 93 回日本生化学会大会、web 開催、2020 年 9 月 14–16 日
- 宮崎亮次、吉谷亘平、森 博幸、秋山芳展 細菌の外膜生合成と品質管理に関わる 2 機能性プロテアーゼ BepA の基質認識機構 第 93 回日本生化学会大会、web 開催、2020 年 9 月 14–16 日
- 横山達彦、新苗智也、津曲和哉、今見考志、石濱泰、檜作洋平、秋山芳展 大腸菌 S2P ファミリー プロテアーゼ RseP の基質探索：鉄取り込みに関与する転写制御因子の切断とその生理的意義 第 93 回日本生化学会大会、web 開催、2020 年 9 月 14–16 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

本分野では、体の生理変化に適応するための臓器リモデリング機構について、組織幹細胞制御機構を基軸として研究を進めている。特に、臓器リモデリングが急速に進行する妊娠期の母体に着目し、組織幹細胞ダイナミクス、多細胞・多臓器間ネットワーク、メカノバイオロジーの観点から妊娠期の皮膚や肝臓のリモデリング機構について解析している。胎児の発生の場としての母体の機能解明と、母体リモデリング機構の再生医療への応用を目指す。

1) 皮膚拡張時における増殖能の高い表皮幹細胞の出現には血管が重要であることを発見

皮膚は、体の生理変化や体形変化に応じて拡張・収縮するダイナミックな臓器である。我々は以前、急速に拡張する妊娠期の腹部皮膚において、表皮幹細胞から増殖性の高い $Tbx3$ 陽性の基底細胞が産生されることを見出し、この細胞群の出現は真皮の α SMA⁺Vimentin⁺ 細胞が分泌する Igfbp2 などの液性シグナルに依存することを報告した (Ichijo et al., *Nat Commun.* 2017)。本年度は、 $Tbx3$ ⁺ 基底細胞の細胞運動と出現機構を解析した。まず、 $Tbx3$ ⁺ 基底細胞は周囲の細胞に ADAM8 の発現を誘導し、EGF-ERK シグナルを活性化して表皮増殖クラスター (EPC) を形成することを明らかにした。また、単一細胞系譜解析の結果から、 $Tbx3$ ⁺ 基底細胞は出産後には分化して表皮から排除される運命をたどることが分かった。一方で、足底部表皮のように増殖性が高い領域では $Tbx3$ ⁺ 基底細胞が幹細胞として存在し、EPC を恒常的に維持していた。 $Tbx3$ ⁺ 基底細胞の時空間に依存した出現機構を明らかにするため真皮の単一細胞遺伝子発現解析を実施した結果、妊娠期には血管新生に関する血管クラスターの割合上昇が認められた。実際、妊娠期では腹部皮膚で血管新生が観察され、

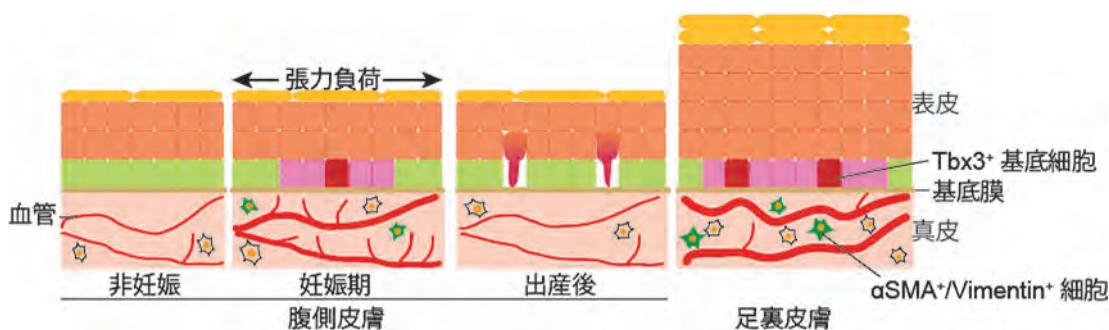


Fig. 1. Vasculatures induce dermal/epidermal remodeling in dynamic skin

かつ足底部皮膚では恒常に血管網が発達していた。また、血管新生を阻害すると妊娠期における Tbx3⁺ 基底細胞と EPC の出現が抑制され、血管新生を誘導すると Tbx3⁺ 基底細胞が誘導された。さらに腹側皮膚に張力を負荷して伸展させたところ、血管新生が誘導され、それに依存して Tbx3⁺ 基底細胞と EPC が出現した。また、真皮の aSMA⁺Vimentin⁺ 細胞の出現と Igfbp2 の発現も、血管新生に依存することが分かった。これらの結果から、血管が真皮と表皮のリモデリングを誘導し、体表領域や生理変化に合わせて皮膚の形態や伸展を制御していることが明らかとなった(図 1)。これらの成果は皮膚の再生医療に貢献できると考えられる。

2) plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting (pCriMGET) システムの開発

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 Crisper/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 (plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting) プラスミドを作製し、*CAG promoter-EGFP Transgenic* (Tg) マウス、*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、および *Clec4f* 遺伝子座に *IRES-hDTR-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.2)。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。本研究は本年度 Scientific Report に発表された。

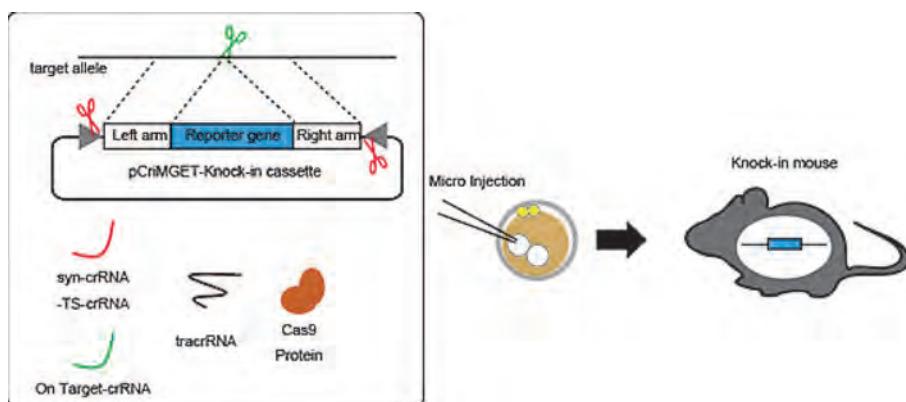


Fig. 2. Scheme of Knock-in and Tg mouse generation via pCriMGET system.

1) Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs

Skin, an essential barrier, is a dynamic organ that expands and shrinks flexibly in response to physiological changes in body shape. We have previously shown that the epidermal basal layer of rapidly expanding abdominal skin of pregnant mice harbors highly proliferating interfollicular epidermal stem cell (IFESC) progeny that expresses Tbx3 necessary for their proliferation and skin expansion. In this year, we have investigated the functions of IFESC-derived Tbx3⁺-basal cells (Tbx3⁺-BCs) in skin expansion and their cell fate after parturition. We found that Tbx3⁺-BCs shape basal epidermal proliferating clusters (EPCs) by inducing ADAM8-ERK signaling in their neighboring cells. Single clonal lineage tracing revealed that Tbx3⁺-BC clones emerge in the abdominal epidermis during pregnancy, followed by differentiation after parturition. We further found that in the plantar epidermis, where high level of BC proliferation is maintained in homeostasis, Tbx3⁺-BCs are sustained as long-lived SCs to maintain EPCs invariably. We showed that Tbx3⁺-BCs are vasculature-dependent IFESC populations, and identified mechanical stretch as an external cue for the vasculature-driven EPC formation. Our results uncover vasculature-mediated IFESC regulations, which explain how epidermis adjusts its size in orchestration with dermal constituents in dynamic skin.

2) Genome editing with the donor plasmid equipped with synthetic crRNA-target sequence.

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 the plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting (pCriMGET), which had crRNA (or sgRNA) target sites on 5'- and 3' ends of MCS in advance, and we established *CAG-promoter EGFP* *Tg* mouse, *3xFlag-2A-EGFP* in-frame knock-in mice at *T-box transcription factor3* (*Tbx3*) gene locus, and *IRES-hDTR-2A-EGFP* in-frame knock-in mice at *C-type lectin domain family 4, member f* (*Clec4f*) gene locus with CriMGET system (Fig.1). It suggested that pCriMGET system was very powerful method to save researchers' efforts, time and cost in establishment of transgenic or gene targeted cells and animals.

List of Publications

Ishibashi R, Abe K, Ido N, Kitano S, Miyachi H, Toyoshima F. (2020). Genome editing with the donor plasmid equipped with synthetic crRNA-target sequence. *Sci. Rep.* 10, 14120

List of Presentations

小田裕香子、豊島文子 タイトジャンクションの形成を誘導する新規生理活性ペプチドの同定と解析 第73回日本細胞生物学会、紙面開催、2020年6月9日-11日

Yukako Oda, Fumiko Toyoshima Dissecting the mechanism of tight junction induction upon inflammation 第43回分子生物学会、オンライン開催、2020年12月2日-4日

石橋理基、阿部浩太、井戸那奈美、北野さつき、宮地均、豊島文子 CRISPR Cas9 遺伝子ターゲッティング技術における汎用型ドナープラスミドの開発 第43回日本分子生物学会年会、オンライン開催、2020年12月2-4日

上月智司、豊島文子 妊娠期肝臓の恒常性を維持する細胞ダイナミクスとその分子基盤の解明 第27回肝細胞研究会、オンライン、2020年12月15-16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。2020年においては、理論が予測した少数分子の操作による細胞分化システムの制御を実験発生生物学者との共同研究により実現した。また、化学反応系の振る舞いをネットワーク構造から決定する新しい理論を構築した。その他、複数の生命現象に対して、数理モデルを用いた研究を展開した。

1) ネットワーク構造に基づき理論が予測した少数遺伝子による細胞分化システムの制御

生命科学の発展により、多くの生物現象が多数種の遺伝子が相互作用する複雑な制御ネットワークシステムに基づいていることが示されてきた。それらシステム全体が作り出すダイナミクスが、生命現象の起源だと考えられている。例えば、ホヤの初期発生で7通りの異なる組織の分化をつかさどるシステムとして、90以上の遺伝子と数百の制御を含む遺伝子制御ネットワークが同定されている。一方で制御ネットワークは相互作用の骨格だけを示しており、その情報に加えて関数やパラメータを仮定しなければ、ダイナミクスを決定できないと考えられてきた。これに対して我々は、制御ネットワークの構造だけから、一部の重要な分子を決定できる数学理論を、構築してきた。この理論によれば、ネットワークの構造だけから決まる Feedback vertex set (FVS) を観測／制御することで、システム全体のダイナミクスを観測／制御できるはずである。この理論に基づき、実際のホヤ肺を用いて細胞分化システムの制御実験を行った。FVSとして定められた5つの遺伝子を人工的に活性化あるいは抑制する2⁵通りの網羅的制御実験を行った。制御実験の結果得られた操作胚の遺伝子発現の多様性は、正常発生で観察される7通りの細胞分化状態のうち、6通りを含むことが分かった。ホヤの遺伝子ネットワークの情報は、細胞分化を

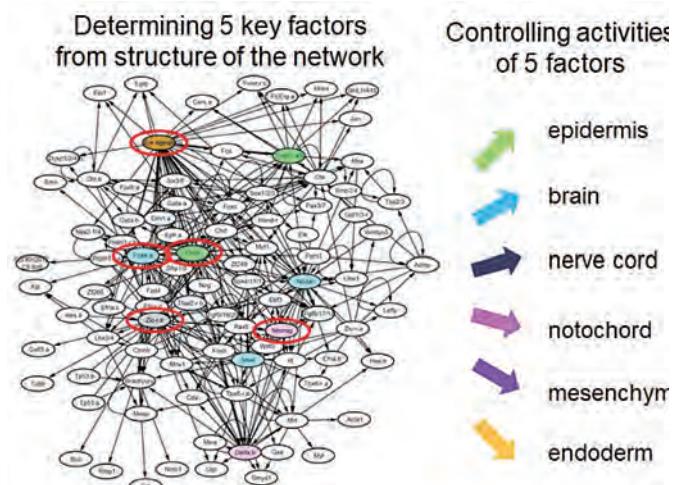


Fig. 1. Controlling cell-fate specification system by FVS genes.

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。

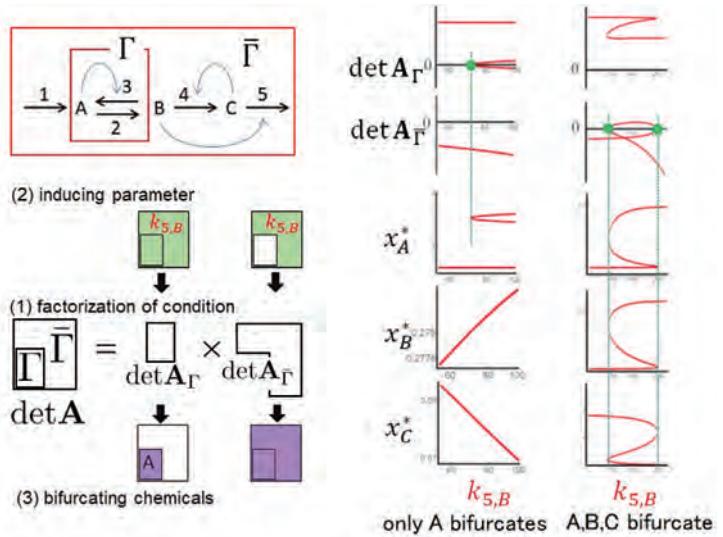


Fig. 2. Decomposition of bifurcation condition/behaviors of an example network. Left: theoretical analysis, right: numerical results.

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

Yuji Sakai Y., Koyama-Honda I., Tachikawa M., Knorr R. L. and Mizushima N. (2020) Modeling Membrane Morphological Change during Autophagosome Formation. *iScience* 23 (9), 101466.

List of Presentations

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） 三重大学病理医学セミナー，三重大学（三重県津市），2020年1月10日

望月敦史 生命システムの振る舞いをネットワークの形だけから予測する（招待講演） 生物物理若手の会夏の学校，オンライン，2020年8月26日

望月敦史 理論とデータの協働によるネットワークシステムの解明（招待講演） 日本数理生物学年会企画シンポジウム，オンライン，2020年9月21日

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

幹細胞遺伝学分野
Laboratory of Stem Cell Genetics

教 授	遊佐 宏介	Prof.	Kosuke Yusa
助 教	樽本 雄介	Assist. Prof.	Yusuke Tarumoto
助 教	西淵 剛平	Assist. Prof.	Gohei Nishibuchi
助 教	青木 一成	Assist. Prof.	Kazunari Aoki

当分野は、2018年（平成30）年10月に新規に発足した研究室であり、ほ乳類細胞における順遺伝学的手法を基盤技術として、ヒト多能性幹細胞の未分化維持および分化機構の解明、また、ヒトがん細胞の増殖に関わる遺伝子の探索と機能解析を主たるテーマとして研究を行なっている。順遺伝学的手法のさらなる技術解析も重要な研究テーマとしている。

研究室が発足してから二年強が経ち、研究室の整備と人材のリクルートをほぼ完了することができた。まず、研究室整備に関しては2019年度中に基本的実験は問題なく行うことができるようになったが、2020年度には培養細胞および分子生物学の両実験室に当初予定した機器の追加、更新を行うことができ、一通りの整備を終えることができた。また、研究室スタッフのリクルートでは、4月より青木一成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。これにより3助教のリクルートを終え、本格的な研究活動が開始できる体制となった。また、Raghda Khatabさんが研究生（国費留学生）として研究室に加わった。

本年は、これまで注力して進めたCRISPR-KOスクリーニング法によるがん細胞の生存・増殖必須遺伝子の網羅的探索より見出された候補遺伝子のうち、急性骨髓性白血病（AML）に関わる2候補について機能解析また治療応用への可能性に関する論文報告を行ったので、その概要を以下に示す。

まず、一つ目はヒストンアセチル化酵素KAT7に関する機能解析である。CRISPR-KOスクリーニングの結果から*MLL*遺伝子転座型AMLに特異的に増殖依存性が観察され、実際、個別の遺伝子破壊実験においても同様の増殖依存性が確認された。*KAT7*遺伝子破壊により、ミエロイド系細胞への分化とアポトーシスの亢進が起こり、このため細胞の増殖が低下すると考えられた。次に、KAT7のターゲットとなるヒストン修飾を調べた結果H3K14とH4K12の二つが影響を受けることが明らかとなった。アセチル化活性を欠損する変異型KAT7に発現を置き換えたところ、やはり*KAT7*ノックアウトと同様の増殖低下、ミエロイド系細胞への分化が観察され、KAT7はアセチル化を介して*MLL*遺伝子転座型AMLの増殖を支えていることがわかった。このことは、KAT7に対するアセチル化活性阻害剤が*MLL*遺伝子転座型AMLの新規分子標的薬となることを強く示唆する結

果である。KAT7 のゲノム上での結合部位を ChIP-seq 法により解析した結果、KAT7 結合部位は、*MLL* 遺伝子転座により生じる融合遺伝子産物の結合部位の一部と重なっており、これら一群の遺伝子が *KAT7* 遺伝子破壊後に特に強い発現低下を受けることが明らかとなった。これらの結果は、強力な発がん活性を有する *MLL* 融合遺伝子産物の下流遺伝子の発現に KAT7 によるヒストンアセチル化が必須であることを示唆しており、KAT7 の治療標的妥当性を裏付けるものであった。KAT7 阻害剤は現在理化学研究所との共同研究で開発に着手しており、今後の結果が期待される。

二つ目の候補はリン酸化酵素 SIK3 (Salt-inducible kinase 3) である。これは、樽本助教が前職 (Cold Spring Harbor Laboratory, Vakoc 研究室博士研究員) の期間に、リン酸化ドメインに着目した CRISPR-KO スクリーニングにより見出した AML 細胞の増殖必須遺伝子である (Molecular Cell, 69, 1017-1027, 2018)。これまでのエピゲノム解析などから、AML において SIK3 は転写因子 MEF2C の抑制性因子であるヒストン脱アセチル化酵素 HDAC4 を抑制することで、AML の増殖に重要な MEF2C の機能を維持していることを明らかにしている。MEF2C の高発現が AML の悪性化・治療抵抗性と強く相関することから、MEF2C は AML の重要な治療標的と考えられるが、小分子化合物を用いた転写因子の阻害は未だ技術的に困難である。今回 Dana-Farber Cancer Institute と共同研究をおこない、彼らが近年開発した SIK 阻害剤 YKL-05-099 が、マウスモデルにおいて MEF2C の機能を抑制し AML の悪性化を防ぐことができるか検証した。まず、SIK3 の阻害によって AML のコロニー形成が強く阻害される条件下でも、正常な造血幹細胞および前駆細胞に対する影響は小さいことを観察した。すなわち正常な造血を妨げることなしに AML を特異的に阻害できることを示唆している。AML 細胞株に対して YKL-05-099 を処理すると、SIK3 ノックアウトと同様の遺伝子発現変化や増殖への影響がみられ、YKL-05-099 が SIK3 を阻害できていることが確認された。さらに、*MLL* 遺伝子転座をもつ 2 種類のマウスモデル (マウス AML 細胞モデルとヒト患者腫瘍組織移植モデル) に対して YKL-05-099 を投与したところ、マウス体内での AML の増殖が抑制され、AML 移植マウスの生存期間が有意に延長できた。これらの結果は SIK 阻害剤が MEF2C 依存的な AML の治療に有効であることを示しており、現在は SIK3 阻害剤のさらなる改良を試みている。

Our laboratory, Stem Cell Genetics, 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.

Two years have now been passed since the lab was established in 2018. In addition to the basic cell culture and molecular biology equipment that was introduced in the previous year, we were able to acquire more

equipment in 2020 and thus our laboratory is now fully equipped. A new staff scientist, Assistant Professor Kazunari Aoki from Osaka University joined and started his work in our laboratory. Ms Raghda Khatab joined our laboratory as a MEXT scholar.

Previously we catalogued cell-essential genes in acute myeloid leukemia (AML) cell lines using CRISPR-KO screening we developed. This year, we published papers describing the molecular mechanism and possibility of clinical application for two genes, namely KAT7 and SIK3.

KAT7 was identified as a cell-essential gene specific to AML cell lines carrying *MLL* rearrangement. This rearrangement creates oncogenic fusion genes between *MLL* and various partners. The frequency of *MLL*-rearranged AML is ~10% and it is associated with intermediate to poor prognosis. The major treatment for AML is chemotherapy and this has not been changed over several decades. Although the overall survival is improving, patients with *MLL*-rearranged AML commonly become refractory to such treatment. Previous studies identified a few candidates for targeted therapy, which have been under clinical assessment. From our own CRISPR screening, we identified KAT as a novel essential gene in *MLL*-rearranged AML and conducted follow-up research.

Upon *KAT7* knockout, AML cells carrying *MLL* fusion gene show reduced proliferation associated with increased levels of apoptosis and CD11b myeloid marker expression. Molecular analyses revealed that H3K14 and K4K12 acetylation were lost in *KAT7*-KO cells irrespective of *MLL* genotype. To confirm whether KAT7 essentiality is uniquely associated with histone acetylation activity, we expressed HAT-dead KAT7 mutant and inactivated endogenous *KAT7*. Cells expressing HAT-dead KAT7 lost H3K14 acetylation and concomitantly show reduced proliferation as well as increased CD11b expression. This strongly suggests that HAT activity is essential for KAT7 function and that HAT inhibitor may have an anti-cancer effect.

To investigate the association of KAT7 with MLL fusion, we analyzed KAT7 binding sites by ChIP-seq and found that KAT7 is strongly bound to a fraction of MLL fusion protein targets. These includes essential genes such as *JMJD1C*, *PBX3* and *MEIS1*. Upon *KAT7* knockout, expression of these genes was rapidly downregulated, suggesting that KAT7 is essential to support the expression of MLL fusion target genes.

We have initiated development of KAT7 inhibitor in collaboration with RIKEN and hope the success in the development and the future clinical use.

SIK3 plays an important role in the expression of lineage-defining genes and metabolic controllers through the regulation of transcriptional co-regulators. Assistant Professor Tarumoto used kinase domain-focused CRISPR-KO screening during his postdoctoral research at Cold Spring Harbor Laboratory (Vakoc lab) and identified SIK3 requirement for AML growth (Molecular Cell, 69, 1017-1027, 2018). Epigenomic analyses have revealed that SIK3 is critical to maintain the function of lineage-defining transcription factor MEF2C in AML by phosphorylating histone deacetylase 4 (HDAC4), a repressive cofactor of MEF2C. Considering that high MEF2C expression is associated with poor prognosis of AML, MEF2C is a critical target in AML.

However, direct inhibition of transcriptional factors with small molecules is still challenging.

In the collaboration study with Dana-Farber Cancer Institute, we evaluated whether chemical inhibition of SIK3 attenuates AML growth in mouse model by suppressing MEF2C function using a newly developed tool compound YKL-05-099. First, we confirmed that SIK3 inhibition strongly suppressed colony formation of AML cells, but not normal hematopoietic stem and progenitor cells, suggesting that there is therapeutic window of SIK inhibition in AML. YKL-05-099 treatment to AML cell lines *in vitro* led to several defects in epigenetic and transcriptional regulation related to MEF2C function as observed in *SIK3*-KO cells *in vitro*, which confirmed the on-target inhibition of SIK3 kinase activity by YKL-05-099. Furthermore, administration of YKL-05-099 to mouse models of *MLL*-rearranged AML (mouse AML & human patient-derived xenograft transplantations) significantly attenuated AML development *in vivo* and extended mouse survival. These data indicate that SIK inhibition is a potential therapeutic option in MEF2C-addicted AML. We are currently improving the potency and specificity of SIK inhibitor for use in the clinic.

List of Publications

<原著論文>

Nagarajan S, Rao SV, Sutton J, Cheeseman D, Dunn S, Papachristou EK, Prada JG, Couturier DL, Kumar S, Kishore K, Chilamakuri CSR, Glont SE, Archer Goode E, Brodie C, Guppy N, Natrajan R, Bruna A, Caldas C, Russell A, Siersbæk R, Yusa K, Chernukhin I, Carroll JS. (2020). ARID1A influences HDAC1/BRD4 activity, intrinsic proliferative capacity and breast cancer treatment response. **Nat Genet.** 52, 187-197.

Au YZ, Gu M, De Braekeleer E, Gozdecka M, Aspris D, Tarumoto Y, Cooper J, Yu J, Ong SH, Chen X, Tzelepis K, Huntly BJP, Vassiliou G, Yusa K. (2020). KAT7 is a genetic vulnerability of acute myeloid leukemias driven by MLL rearrangements. **Leukemia.** doi: 10.1038/s41375-020-1001-z. Online ahead of print.

Thompson O, von Meyenn F, Hewitt Z, Alexander J, Wood A, Weightman R, Gregory S, Krueger F, Andrews S, Barbaric I, Gokhale PJ, Moore HD, Reik W, Milo M, Nik-Zainal S, Yusa K, Andrews PW. (2020). Low rates of mutation in clinical grade human pluripotent stem cells under different culture conditions. **Nat Commun.** 11, 1528.

Tarumoto Y, Lin S, Wang J, Milazzo JP, Xu Y, Lu B, Yang Z, Wei Y, Polyanskaya S, Wunderlich M, Gray NS, Stegmaier K, Vakoc CR. (2020). Salt-inducible kinase inhibition suppresses acute myeloid leukemia progression *in vivo*. **Blood.** 135, 56-70.

<総説>

遊佐宏介 (2020). CRISPR-KO スクリーニングによるがん治療薬候補の優先化 医学のあゆみ 273,

258-259

遊佐宏介 (2020). CRISPR スクリーニングによる肝細胞制御因子の網羅的探索 医学のあゆみ 273, 443-449

遊佐宏介 (2020). CRISPR-Cas9 システムの遺伝学スクリーニングへの応用 医学のあゆみ 273, 806-811

樽本雄介、遊佐宏介 (2020). CRISPR/Cas9 による遺伝学的スクリーニングシステムの開発 生体の科学 71, 614-619

遊佐宏介 (2020). 医療・創薬に向けた CRISPR スクリーニング 遺伝子医学 10, 34-39

樽本雄介 (2020). SIK3 抑制による急性骨髓性白血病の制御 血液内科 81, 529-534

List of presentations

<招待講演>

遊佐宏介 Development and application of CRISPR-KO screening 微研ブリッジセミナー 大阪大学
微生物病研究所 2020年2月7日

遊佐宏介 Development and application of CRISPR-KO screening 熊本大学 HIGO プログラム最先端
研究セミナー 熊本大学（オンライン） 2020年7月29日

遊佐宏介 CRISPR-KO スクリーニングの開発とがん研究への応用 第79回 日本癌学会学術総会
広島 2020年10月1-3日

遊佐宏介 CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用 千里ライフサイエンスセミナー「ゲノム編
集がもたらす革新と更なる展望」 千里ライフサイエンスセンター（大阪、オンライン） 2020
年11月10日

Kosuke Yusa Development and application of CRISPR-KO screening 第43回日本分子生物学会年会
神戸（オンライン） 2020年12月2-4日

<一般講演>

Aoki K, Kurashige M, Ichii M, Sugiyama T, Higaki K, Kaito T, Ando W, Sugano N, Sakai T, Shibayama H,
HANDAI Clinical Blood Club, Takaori-Kondo A, Morii E, Kanakura Y, and Nagasawa T. Identification
of CXCL12-abundant reticular cells in human adult bone marrow. 82nd Annual Meeting of the Japanese
Society of Hematology. PS1-1 (2020)

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 and Therapeutics

教 授	伊藤 貴浩	Prof.	Takahiro Ito
准教授	服部 鮎奈	Assoc. Prof.	Ayuna Hattori
助 教	松浦 順教	Assist. Prof.	Kenkyo Matsuura

がん・幹細胞シグナル分野は伊藤が米国ジョージア大学から異動して昨年度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、主に哺乳動物の成体組織および腫瘍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。2020年4月に初めて薬学部から4回生2名を受け入れ、研究指導を開始した。また10月付で服部准教授が着任し、教育研究指導体制が整った。

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。伊藤研究室では前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産生する酵素トランスアミナーゼの一種である。昨年、BCAT1 が BCKA から BCAA に変換する過程を生

きた白血病細胞中でリアルタイムに検出する技術を確立し、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。また、BCAT1 機能阻害によって生じる白血病幹細胞の分化誘導について、網羅的遺伝子発現解析からいくつかの細胞内シグナル経路の関与を見出しており、BCAA 代謝による幹細胞運命の新たな制御機構が明らかになると期待している。

RNA 結合因子による正常幹細胞およびがん幹細胞の制御機構

生体を構成する細胞の多くは、日々失われ、新たな細胞へと置き換わる。この仕組みを支えるのが組織幹細胞である。幹細胞は、自己複製能と多分化能を保つ特殊な細胞で、常に新しい前駆・成熟細胞を供給することで、怪我や環境ストレスによる組織の損傷を修復し個体の恒常性を維持している。また、一部のがん組織においても、未分化度の高いがん幹細胞を頂点とした階層が存在することが明らかにされた。幹細胞の制御に与る経路については、山中 4 因子をはじめとして多くの転写因子が同定されてきたが、転写後調節に関与する RNA 結合タンパク質についても、幹細胞性維持に機能することが示されている。その一つとして、白血病のがん幹細胞の維持機構に RNA 結合タンパク質 Musashi2 (Msi2) が必須であることが報告された。Msi2 は、分化誘導因子 Numb の発現抑制や BCAT1 の発現上昇を介して、がん幹細胞性の維持に寄与することが明らかになった。Msi2 の標的 RNA が明らかになりつつある一方で、Msi2 の幹細胞維持活性がどのように調節されているかは不明なままである。私たちは、Msi2 タンパク質が特徴的な翻訳後修飾を受けることを示す知見を得た。この修飾が Msi2 を不活性化する制御機構として働くことで、不活性化型 Msi2 を多くもつ幹細胞では自己複製能を維持できずに分化に至るのではないかとの仮説を立てた。現在、この作業仮説を細胞・個体レベルで検証し、幹細胞の運命が Msi2 活性制御により決定されるか明らかにすることを目指している。

乳がんにおける細胞内代謝によるがん細胞悪性化制御機構

乳がんは女性が罹患するがんの中では最も頻度が高く、罹患率、死亡率共に増加傾向にある。研究の進展により、乳がんは遺伝子発現パターンによっていくつかのサブタイプに分類されることが分かっている。乳がん細胞が発現する受容体を標的としたホルモン療法および抗 HER2 薬等のサブタイプ別に対応した分子標的療法が開発され、患者の予後は大きく改善した。しかしながら、これらの分子標的療法が適用できない場合もあり、その患者では細胞特異性を持たない従来の化学療法に頼らざるを得ず、予後は不良である。私たちは分岐鎖アミノ酸代謝酵素 BCAT1 の発現がサブタイプ間で有意に差があることを見出した。また、BCAT1 が高発現している乳がん細胞では、BCAT1 の機能抑制は細胞増殖を顕著に抑制した。これらの知見は、BCAT1 による BCAA 代謝経路の制御が特定のサブタイプの乳がんにおいて重要な役割を果たすことを示唆しており、このように BCAA 代謝への依存度の高いがん種に対する効果的な治療法の創出に繋がる研究を目指している。

The long-term goal of the research programs in the Ito laboratory is to elucidate the mechanisms and regulation of cell fate decisions 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 previous studies, we have developed a productive and innovative research program by incorporating cross-disciplinary approaches such as metabolomics and NMR spectroscopy. 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 and institutional seminars. In essence, we discovered a novel regulatory mechanism by an aminotransferase that sustains 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 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 of the University of Georgia and have shown that BCAT1 promotes intracellular BCAA production, not their breakdown. 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.

Regulation of stem cell self-renewal and oncogenesis by RNA binding proteins

Throughout lifespan, multicellular organisms rely on stem cell systems. After birth, tissue stem cells maintain properly functioning tissues and organs under homeostasis as well as promote regeneration after tissue damage or injury. Stem cells are capable of self-renewal, which is the ability to divide indefinitely while retaining the potential of differentiation into multiple cell types. The ability to self-renew, however, is a double-edged sword; the molecular mechanisms of self-renewal can be a target of malignant transformation driving tumor development and progression. Growing lines of evidence have shown that RNA-binding proteins (RBPs) play pivotal roles in the regulation of self-renewal by modulating metabolism of coding and non-coding RNAs both in normal tissues and in cancers. Musashi2 (Msi2) is one of these RBPs identified as a key regulator of leukemia stem cells; Msi2 maintains stem cell function through upregulation of BCAT1

protein level and downregulation of Numb, a protein involved in the determination of cell fate. While the target RNAs of Msi2 have been identified, it remains unclear how the biologic activity of Msi2 is regulated. Our recent data show that the Msi2 protein undergoes a characteristic post-translational modification. We hypothesized that this modification acts as a regulatory mechanism to inactivate Msi2, and the stem cells with high levels of inactivated Msi2 are unable to maintain their self-renewal capacity, which in turn lead to cell differentiation.

Breast cancer regulation by branched-chain amino acids

Breast cancer is the most frequent type of cancer in women and is categorized into several subtypes based on their gene expression patterns. Patient prognosis has been improved by the development of hormone and molecular targeted therapies, such as anti-HER2 agent, for specific subtypes. Because these therapies are not applicable in some cases, these patients need to rely on conventional chemotherapeutics, and therefore the prognosis is often worse. We found that the expression patterns of branched-chain amino acid (BCAA) metabolic enzymes are distinct among the subtypes of breast cancer patients and patient-derived cell lines. Furthermore, the suppression of BCAT1, a BCAA transaminase, results in attenuated cancer cell growth. Based on these observations, we hypothesize that certain types of breast cancer exhibit dependency on BCAA for growth. This study will help to understand the biology of mammary tumors and develop a new therapeutic strategy for the BCAA-dependent breast cancers.

List of Publications

- Spinler K, Bajaj J, Ito T, Zimdahl B, Hamilton M, Ahmadi A, Koechlein CS, Lytle N, Kwon HY, Anower-E-Khuda F, Sun H, Blevins A, Weeks J, Kritzik M, Karlseder J, Ginsberg MH, Park PW, Esko JD, Reya T. (2020) A stem cell reporter based platform to identify and target drug resistant stem cells in myeloid leukemia. **Nat Commun** 11:5998.
- Fujiwara, T., Hattori, A., Ito, T., Funatsu, T., Tsunoda, M. (2020) Analysis of intracellular α -keto acids by HPLC with fluorescence detection. **Anal Methods** 12, 2555-9.
- Machida Y., Nakagawa, M., Matsunaga H, Yamaguchi M, Ogawara Y, Shima Y, Yamagata K, Katsumoto T., Hattori A, Itoh M, Seki T, Nishiya Y, Nakamura K, Suzuki K, Imaoka T, Baba D, Suzuki M, Sampetrean O, Saya H, Ichimura K, and Kitabayashi I. (2020). A potent blood–brain barrier-permeable mutant IDH1 inhibitor suppresses the growth of glioblastoma with IDH1 mutation in a patient-derived orthotopic xenograft model. **Mol Cancer Ther** 19, 375-83.
- Nakagawa, M., Nakatani, F., Matsunaga, H., Seki, T., Endo, M., Ogawara, Y., Machida, Y., Katsumoto, T., Yamagata, K., Hattori, A., Fujita, S., Aikawa, Y., Ishikawa, T., Soga, T., Kawai, A., Chuman, H., Yokoyama, N., Fukushima, S., Yahiro, K., Kimura, A., Shimada, E., Hirose, T., Fujiwara, T., Setsu, N., Matsumoto, Y., Iwamoto, Y., Nakashima, Y., Kitabayashi, I. (2019) Selective inhibition of mutant IDH1

by DS-1001b ameliorates aberrant histone modifications and impairs tumor activity in chondrosarcoma. *Oncogene* 38, 6835-49.

服部 鮎奈 (2020) 「がん組織における分岐鎖アミノ酸代謝制御」 医学のあゆみ, 273, 415-423.

服部 鮎奈 (2020) 「白血病における細胞内アミノ酸代謝と治療標的」 血液内科, 80, 570-576.

松浦 顕教 (2020) 「タンパク質翻訳後修飾とがん幹細胞制御」 医学のあゆみ, 273, 430-435.

Presentations

Ito, T. *Metabolic reprogramming and regulation of cancer cell fates*. The 93rd Annual Meeting of Japanese Biochemical Society. Invited talk. Virtual conference, September 2020.

Ito, T. *Uncovering the metabolic reprogramming of stem cell fates in leukemia*. The 79th Annual Meeting of Japanese Cancer Society. Invited talk. Hiroshima, October 2020.

Ito, T. *Reprogramming cell fates by RNA binding proteins in development and cancer*. The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Invited talk. Virtual conference, December 2020.

Ito, T. *Metabolic regulation of cell fates in cancer*. Institut de Recherche en Cancérologie Montpellier (IRCM). Invited talk. Virtual seminar, December 2020.

Hattori A, Kitabayashi I, Ito T. *Regulation of amino acid metabolism in myeloid leukemia*. The 79nd Annual Meeting of the Japan Cancer Association. Invited talk. Hiroshima, October 2020.

Hattori A, Kitabayashi I, Ito T. *Branched-chain Amino acids and regulation of human leukemia*. The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Invited talk. Virtual conference, December 2020.

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science
幹細胞デコンストラクション分野
Laboratory of Deconstruction of Stem Cells

教 授 今吉 格 Prof. Itaru Imayoshi

本分野では、脳神経系の発生・発達・可塑性について研究を行っている。特に、神経幹細胞の制御機構とニューロン新生という現象に着目し、分子遺伝学・光遺伝学やライブイメージングという技術を駆使して、研究を進めている。複雑かつ精緻な哺乳類の脳神経系は、遺伝的プログラムに従い再現性良く発生・発達することが重要である。一方で、生後発達過程や成体においても、哺乳類の脳は柔軟な可塑的性質を持っている。動物の行動や高次脳機能を制御する脳神経系が形成され、様々な生後の環境入力や経験に基づいて発達する過程の基盤メカニズムについて、研究を行なっている。

1) 神経幹細胞において遺伝子発現を光操作する手法の開発

光作動性のイオンチャネルやイオントランスポーターをニューロン（神経細胞）に発現させ、ニューロンの神経活動を光照射により人為的にコントロールする技術（オプトジェネティクス）が開発され、神経科学研究において重要な技術として普及が進んでいる。近年では、様々な光作動性の機能性分子を用いて、細胞内局在・細胞シグナル・遺伝子発現・細胞骨格など、多くの細胞機能を光操作できるツールの開発が目覚ましい勢いで進んでいる。我々は、神経幹細胞を含む哺乳類細胞において、遺伝子発現を青色光を用いて制御できる技術を開発してきた。青色光照射によって制御可能な Photo-Activatable (PA)-Gal4/UAS システムや、青色光と低分子化合物によって活性制御可能な PA-Tet-ON/OFF システムを開発してきた（図 1）。これらの光遺伝学的ツールを使用することで、神経幹細胞において、自己複製や分化運命決定を制御する転写因子の発現を人工的にコントロールすることが可能になった。光を用いた遺伝子発現制御ツールにおいては、既存の遺伝子発現制御技術に比べて、より優れた時間的解像度にて操作が可能であり、これまで実験的に検証が困難であったような、遺伝子発現の振動などがもつ機能的に意義について、実験的に検証することが可能になる。加えて、神経幹細胞を光でコントロールするという、新しい再生医療技術の開発につながると期待される。

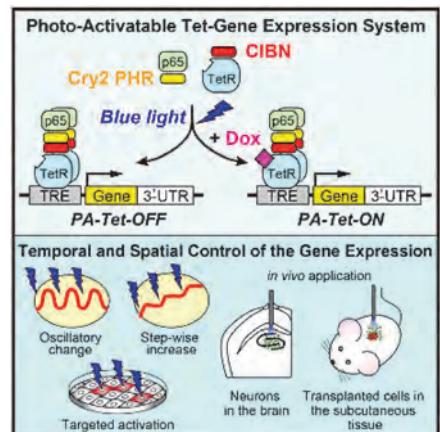


Fig. 1. Optical regulation of gene expressions by photo-activatable transcription factors

2) 神経幹細胞の多分化能と分化運命決定を制御するメカニズムの解析

光作動性の Gal4/UAS システムを用いて、培養神経幹細胞や発生期マウス大脳スライスにおける、bHLH 型転写因子のダイナミックな振動発現の機能的意義の検証を行ってきた。Ascl1 や Hes1 などの bHLH 型転写因子は、神経幹細胞の分化運命決定因子であることが知られている。我々は、これらの bHLH 型転写因子が 2 ~ 3 時間周期でオシレーション（振動発現）することで、神経幹細胞の多分化能と自己複製の両立に貢献することを示した。一方で、bHLH 型転写因子のオシレーションのリズムが崩れて一過性の蓄積発現パターンに変化することが、ニューロンやグリア細胞への分化運命決定において必須の役割を担っていることを示した（図 2）。今後も、遺伝子発現やシグナル伝達のダイナミックな変動が、神経幹細胞の細胞増殖、自己複製、分化運命決定、休眠制御に与える影響について、検証を進めていきたいと考えている。

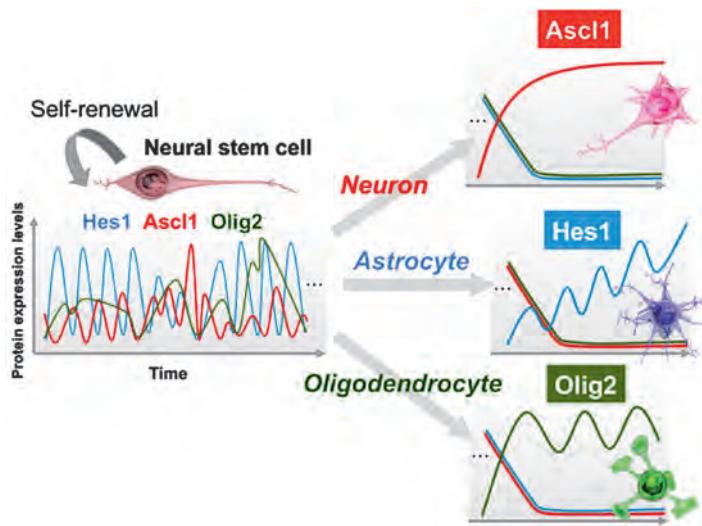


Fig. 2. Oscillatory v.s. sustained expressions of bHLH transcription factors regulate neural stem cells

We aim to understand the cellular and molecular mechanism of the growth and fate-determination of neural stem cells in the developing and adult mammalian brain. We are also interested in the functional significance of postnatal/adult neurogenesis on higher brain functions, such as spatial learning/memory and olfactory-related behaviors. Our lab has expertise in the optical regulation of gene expression and neuronal activity, genetic manipulation of neural development and plasticity, and long-term monitoring of neural circuit plasticity *in vivo* with the two-photon microscope and brain endoscope.

1) Optical manipulation of gene expressions in neural stem cells

Light-inducible gene expression systems represent powerful methods for studying the functional roles of dynamic gene expression. We have developed an optimized light-inducible Gal4/UAS and Tet-ON/OFF gene expression system for mammalian cells. We designed photoactivatable (PA) -transcriptional activators based on the concept of split transcription factors, in which light-dependent interactions between Cry2-CIB1 PA-protein interaction modules can reconstitute a split the DNA binding domain and p65 transcription activation domain. We developed a set of PA-transcriptional activators which differ in terms of induced gene expression levels following pulsed or prolonged light exposure, and which have different activation/deactivation kinetics. These systems offer optogenetic tools for the precise manipulation of gene expression at fine spatiotemporal resolution in mammalian cells (Fig. 1).

2) Regulatory mechanism of neural stem cells

The mammalian brain consists of a complex ensemble of neurons and glial cells. Their production during development and remodeling is tightly controlled by various regulatory mechanisms in neural stem cells. Among such regulations, basic helix-loop-helix (bHLH) factors have key functions in the self-renewal, multipotency, and fate determination of neural stem cells. We have highlighted the importance of the expression dynamics of bHLH factors in these processes. We propose the multipotent state correlates with oscillatory expression of several bHLH factors, whereas the differentiated state correlates with sustained expression of a single bHLH factor. We also developed a new optogenetic method that can manipulate gene expressions in neural stem cells by light. We used this technology to manipulate the growth and fate-determination of neural stem cells.

List of Presentations

今吉格 「Toward understanding and manipulation of neural bases underlying animal behaviors and psychiatric diseases」 第43回日本分子生物学会年会シンポジウム、2020年12月3日

今吉格 「神経幹細胞の制御メカニズムと生後脳・成体脳ニューロン新生」 江崎グリコ株式会社、2021年2月2日

今吉格 「Regulatory mechanism of neural stem cells revealed by optical manipulation of gene expressions」 第11回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム、2021年2月19日

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

情報制御分野
Laboratory of Regulatory Information

客員教授 藤田 尚志 Visiting Prof. Takashi Fujita

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

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

Abe, H., Satoh, J., Shirasaka, Y., Kogure, A., Kato, H., Ito, S. and Fujita, T. (2020). Priming Phosphorylation of TANK-Binding Kinase 1 by I κ B Kinase β Is Essential in Toll-Like Receptor 3/4 Signaling. **Mol Cell Biol** 40, 2020 doi.org/10.1128/MCB.00509-19. March 2020

Duic, I., Tadakuma, H., Harada, Y., Yamaue, R., Deguchi, K., Suzuki, Y., Yoshimura, S. H., Kato, H., Takeyasu, K., and Fujita, T. (2020). Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes. **Nucleic Acids Research**, 2020 1 doi: 10.1093/nar/gkaa935

Abu Tayeh, A., Funabiki, M., Shimizu, S., Satoh, S., Lee, S., Iwakura, Y., Kato, H., and Fujita, T. (2020). Psoriasis-like skin disorder in transgenic mice expressing a RIG-I Singleton–Merten syndrome variant. **International Immunology** 2020 <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa071>

Onizawa, H., Kato, H., Kimura, H., Kudo, T., Soda, N., Shimizu, S., Funabiki, M., Yagi, Y., Nakamoto, Y., Priller, J., Nishikomori, R, Heike, T., Yan, N., Tsujimura, T., Mimori, T., and Fujita, T. (2020). Aicardi–Goutières syndrome-like encephalitis in mutant mice with constitutively active MDA5. **International Immunology** 2020 <https://doi.org/10.1093/intimm/dxaa073>

List of Presentations

藤田尚志 自然免疫活性化によるウイルス感染症予防 第432回生存圏シンポジウム、第14回生存圏フォーラム特別講演会、京都黄檗、2020年11月7日

藤田尚志 自然免疫活性化によるウイルス感染症予防 JBA植物バイオ研究会勉強会、Web開催 2020年12月24日

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

2020年3月に山浦瑞樹と李佳霖が人間・環境学研究科修士課程を修了し、研究室を離れた。4月からYalcin Pisilが、人間・環境学研究科博士課程3年に、また、徐可婧が、人間・環境学研究科修士課程2年に進学した。11月に特定研究員として島崎奈津子と研究生として張原銘が、また12月に研究生として王梓涵が加わった。

当研究室ではレトロウイルス（HIV, SIV, SHIV）および新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）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）。2020年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

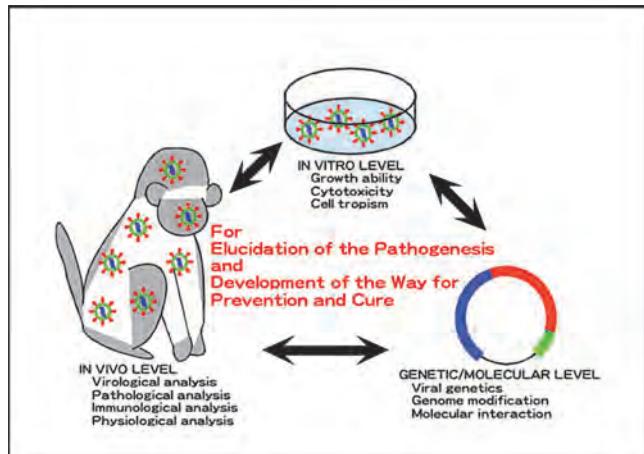


Fig. 1. Research Cycle of Primate Model for Infectious Diseases

シードタイプレンチウイルスを用いた新型コロナウイルス中和活性測定法の開発

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を原因ウイルスとする呼吸器感染症（COVID-19）は、2019年に認識され、世界保健機関の発表では2021年1月末現在、累計1億人以上が感染し、230万人が死亡している。世界的に大きな問題となっている本感染症について、その予防・治療法の開発が強く望まれている。本研究では、マーカーとしてルシフェラーゼ遺伝子を導入したHIVとSARS-CoV-2の外被タンパク遺伝子を組み合わせたシードタイプウイルスを用いて、SARS-CoV-2に対する中和抗体を評価するための、より安全で高感度の中和活性測定法を開発した。この実験では、SARS-CoV-2スパイクタンパク質でコーティングした疑似ウイルスを、SARS-CoV-2の感染受容体であるアンギオテンシン変換酵素2を導入した細胞に感染させた（Fig. 2）。種々の細胞について検討した結果、ネコ腎CRFK細胞が、従来のHEK293T細胞と比較して10倍感受性が高いことがわかった。一方、HIVの感染を促進するために通常使用されるDEAEデキストランやポリブレン試薬は、CRFK

には効果が無いことがわかった。本測定系を用いて市販の新型コロナウイルス感染者回復期血清や中和モノクローナル抗体の中和活性を測定したところ、一般的に抗体医薬として用いられる IgG 型抗体よりも IgA や IgM 型抗体の方が 100 倍以上高い中和活性を示すことを明らかにした。この結果は、今後 COVID-19 に対して抗体医薬による治療法を開発する上で極めて重要な知見である。

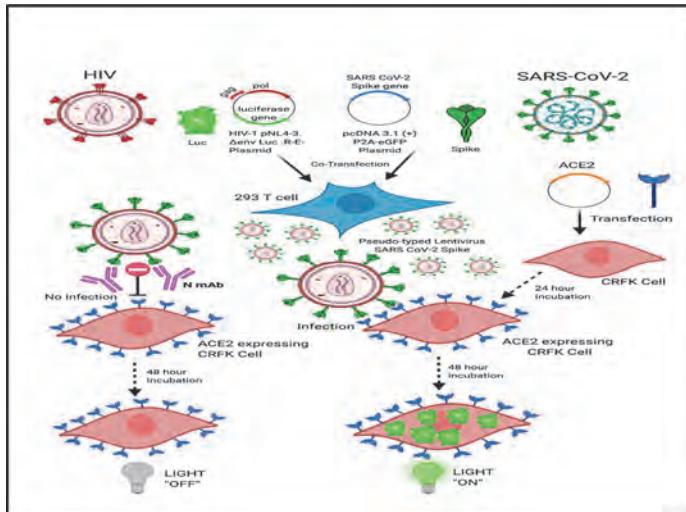


Fig. 2 Neutralization assay using pseudo-type lentivirus covered with spike protein of SARS-CoV-2 and ACE2-expressing cells.

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 Coronavirus (SARS-CoV-2) at the molecular level, cultured cell level and infected individual level (Fig. 1). Representative research progress in 2020 will be described below.

Development of a neutralization assay for SARS-CoV-2 using a pseudo-typed lentivirus

Respiratory tract infection caused by the SARS-CoV-2 (COVID-19) was firstly recognized in 2019. As of the end of January 2021, the World Health Organization has announced that more than 100 million people have been infected by COVID-19 and 2.3 million have died. There is a strong demand for the development of preventive and therapeutic methods for this infectious disease, which has become a major problem worldwide. In this study, it is safer to evaluate neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 using a pseudotyped lentivirus that combines HIV with a luciferase gene introduced as a marker and the outer protein gene of SARS-CoV-2. Developed a highly sensitive neutralizing activity measurement method. In this study, we have developed a safer and more sensitive method for measuring neutralizing activity to evaluate neutralizing antibodies against SARS-CoV-2, using pseudo-type virus that consists of HIV with the luciferase gene introduced as a marker and SARS-CoV-2 spike protein. In this experiment, a pseudovirus coated with SARS-CoV-2 spike protein was infected with cells introduced with angiotensin converting enzyme 2, which is an infection receptor for SARS-CoV-2 (Fig. 2). As a result of examining various cells, it was found that the cat kidney CRFK cells were 10 times more sensitive than the conventional HEK293T cells. On the other hand, DEAE dextran and polybrene reagents commonly used to promote HIV infection have been found to be ineffective against CRFK. When the neutralizing activity of commercially available COVID-19 convalescent sera and neutralizing monoclonal antibody was measured using this measurement system, it was found that neutralizing activities of IgA and IgM type antibodies showed more than 100 times higher than that of IgG

type antibody that generally used as antibody drugs. This result is an extremely important finding for developing a therapeutic method using an antibody drug for COVID-19 in the future.

List of Publications

Pisil, Y., Yazici, Z., Shida, H., Matsushita, S., and Miura, T. (2020). Specific substitutions in region V2 of gp120 *env* confer SHIV neutralisation resistance. *Pathogens*, 9, 181.

Nakamura-Hoshi, M., Takahara, Y., Ishii, H., Seki, S., Matsuoka, S., Nomura, T., Yamamoto, H., Sakawaki, H., Miura, T., Tokusumi, T., Shu, T. and Matano, T. (2020). Therapeutic vaccine-mediated Gag-specific CD8⁺ T-cell induction under anti-retroviral therapy augments anti-virus efficacy of CD8⁺ cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *Sci. Rep.*, 10 (1), 11394.

Thi, D. L., Yamashita-Kawanishi, N., Okamoto, M., Vu, S. N., Sugiura, K., Miura, T., and Haga, T. (2020). Detection and genotyping of bovine leukemia virus (BLV) in Vietnam cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 82 (7), 1042-1050.

List of Presentations

Ishii, H., Terahara, K., Nomura, T., Tokusumi, T., Shu, T., Suzuki, H., Fujiwara, D., Sakawaki, H., Miura, T., and Matano, T. Protective efficacy of a vaccine inducing Gag/Vif-specific CD8⁺ T but not CD4⁺ T cells against repeated intrarectal low-dose SIVmac239 challenges. The 23rd International AIDS Conference. Virtual, July 6-10, 2020.

石井 洋、寺原 和孝、野村 拓志、徳炭 剛、朱 亜峰、阪脇 廣美、三浦 智行、俣野 哲朗 GagVif 特異的 CD8 陽性 T 細胞の選択的誘導による SIV 経直腸感染阻害効果 第34回日本エイズ学会学術集会、WEB 開催、2020年11月27-12月25日

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

ウイルス感染症モデル分野
Laboratory of Infectious Disease Model

教 授 明里 宏文 Prof. Hirofumi Akari

当分野では、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。

HIV 根治療法の確立に向けた基礎・応用研究

本研究では、新規 HIV 感染靈長類モデルを用いて、HIV 感染症の根治治療法創出に向けた前臨床評価研究を行っている。我々はこれまでに、本邦での入手・実験使用が容易であるカニクイザルに感染性を有する「サル指向性 HIV」を用いて長期潜伏 HIV-1 感染靈長類モデルを確立した。このモデルを用いてリザーバーサイズ定量法を確立し、HIV 根治治療法の評価システムが概ね完成した。他方、iPS 技術とゲノム編集技術を応用した CCR5Δ32 造血幹細胞の移植療法を中心とした新たな HIV 根治治療法、および PKC 活性化薬および Bet 阻害薬を組み合わせた HIV 再活性化による shock and kill 療法について検討を進めている。

1. **HIV リザーバーの組織分布 / 動態解析** : HIV 感染靈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、を明らかにした (関、他; 論文準備中)。HIV 感染者においてこれらの情報を得ることは困難であることを鑑みて、非臨床試験における HIV 根治療法の有効性を検証する上で貴重な知見を提供するものと期待される。
2. **iPS 技術とゲノム編集技術を応用した CCR5Δ32 造血幹細胞の移植療法** : ゲノム編集技術を応用して HIV-1 感染リセプターである CCR5 の機能欠損変異 (Δ CCR5) およびマーカー遺伝子をアカゲザル iPS 細胞へ導入し、クローン選抜評価を経て、造血幹細胞からリンパ球やマクロファージへの分化誘導能を保有した Δ CCR5 導入 iPS 細胞由来造血幹細胞 (Δ R5-iHSC) の安定した作出方法を確立した (岩本、他; Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 2021)。現在、サル個体への Δ R5-iHSC 自家移植パイロット実験を行い、 Δ R5-iHSC の骨髄への安定定

着、CD4+ T 細胞等への分化誘導、R5-SHIV 感染制御効果について検討している。

3. リザーバー縮減（shock and kill）療法開発研究：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（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により、潜伏 HIV 感染細胞株からの強力な HIV 誘導活性および、低レベルの T 細胞活性化・炎症性サイトカイン応答を両立することを明らかにした（鷲崎、他；論文投稿中）。現在、健常サル個体における HIV リザーバーの再活性化薬（LRA）および抗 HIV 薬（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を進行中である。

HTLV-1 感染モデルとしての STLV-1 自然感染ニホンザル：感染機序の解明とその応用研究

ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）は成人性 T 細胞白血病（ATL）や HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の原因ウイルスである。本邦では HTLV-1 キャリアは約 100 万人とされ、その約 5% が ATL や HAM の脅威にさらされている。他方、日本固有の野生靈長類であるニホンザルは、HTLV-1 に近縁なレトロウイルスである STLV-1 に高い割合で感染していることが報告されているが、その原因は明らかではなかった。我々のニホンザルコホート調査（N=300）より、①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、② STLV-1 感染個体における抗体価、プロウイルス DNA 陽性細胞率（PVL）およびその頻度分布、HTLV-1 キャリアにおける場合と類似していること、③ニホンザルの季節性繁殖やその生殖様式が高頻度の水平感染に繋がり、そのことが主たる STLV-1 高感染率の原因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。

興味深いことに、STLV-1 は遺伝的にも機能的にも HTLV-1 と高い相同性を有しているにも関わらず、ニホンザルにおける ATL や HAM の発症例はほとんど見られない。この原因を探ることで、発症予防法開発の端緒に繋がる可能性が考えられる。HTLV-1 感染においては CD8+ T 細胞応答がウイルス制御に重要な役割を担っていることが明らかとなっている。これを踏まえ、STLV-1 感染ニホンザルにおける STLV-1 特異的 T 細胞応答について解析を行った。リンパ球短期培養により発現する tax mRNA は、CD8+ T 細胞の共存下では CD4+ T 細胞単独の場合と比較して、顕著な減少が認められた。さらに、抗原発現 CD4+ T 細胞を共培養することにより、CD8+ T 細胞からの IFN- γ 産生が認められた。これらの結果より、CD8+ T 細胞応答が STLV-1 制御に寄与していることが示唆された。また STLV-1 感染ニホンザルは HTLV-1 の動物モデルとして、細胞性免疫応答の機能解析や発症予防ワクチンの評価に有用であると考えられた。現在ウイルス特異的 CD8+ T 細胞誘導型ワクチンによる発症予防免疫の可能性について検討を進めている。

Our laboratory was established in 2013 for active and effective collaboration with Primate Research Institute of Kyoto University. We are investigating the mechanisms for the viral persistency and pathogenesis of

intractable viruses, including human immunodeficiency virus (HIV) and human T-cell leukemia 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. Evaluation in the efficacy of HIV cure therapeutics by the non-human primate model of HIV 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 of HIV-1 infection. In this model, the macaque-tropic HIV-1 generally does not establish persistent infection without ART in the cynomolgus macaques due to efficient control by acquired immune responses, irrespective of the development of ordinary acute viremia the virus. The virus can be re-inducible by transient depletion of CD8+ T cells, indicating the presence of reservoir. Importantly, active HIV reservoir cells are observed in the follicular helper T lymphocytes of lymph nodes, as shown by the successful detection of unspliced viral RNA by qRT-PCR and infectious HIV-1 by quantitative virus outgrowth assay. We will therefore be capable of directly evaluating the efficacy of our HIV cure therapy on the basis of the 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 defective CCR5 as modified by CRISPR/CAS9, and (ii) shock and kill therapy by using latency-reversing agents (LRA) and ART.

2. Japanese macaques naturally infected with STLV-1 as a nonhuman primate model of HTLV-1 infection: analysis of the transmission dynamics.

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. The aim of this study is to examine the epidemiological background by which STLV-1 infection is highly prevalent in JMs. The prevalence of STLV-1 in the JMs rearing in our free-range facility reached up to 64% (180/280 JMs) with variation from 55 to 77% among five independent troops. Anti-STLV-1 antibody titers (ABTs) and STLV-1 proviral loads (PVLs) were normally distributed with mean values of 4076 and 0.62%, respectively, which were mostly comparable to those of HTLV-1-infected humans. Our initial hypothesis that some of the

macaques might contribute to frequent horizontal STLV-1 transmission as viral super-spreaders was unlikely because of the absence of the macaques exhibiting abnormally high PVLs but poor ABTs. Rather, ABTs and PVLs were statically corelated ($p < 0.0001$), indicating that the increasing PVLs led to the greater humoral immune response. Further analyses demonstrated that the STLV-1 prevalence as determined by detection of the proviral DNA was dramatically increased with age; 11%, 31%, and 58% at 0, 1, and 2 years of age, which was generally consistent with the result of seroprevalence and suggested the frequent incidence of mother-to-child transmission. Moreover, our longitudinal follow-up study indicated that 24 of 28 seronegative JMs during the periods from 2011 to 2012 converted to seropositive (86%) four years later; among them, the seroconversion rates of sexually matured (4 years of age and older) macaques and immature macaques (3 years of age and younger) at the beginning of study were comparably high (80% and 89%, respectively), suggesting the frequent incidence of horizontal transmission. Together with the fact that almost all of the full-adult JMs older than 9 years old were infected with STLV-1, our results of this study demonstrated for the first time that frequent horizontal transmission may contribute to high prevalence of STLV-1 infection in JMs. Of note, most of the infected macaques exerted STLV-1-specific T cell response which efficiently suppressed the viral transcription in the infected CD4+ T cells by IFN γ , which may contribute to the poor pathogenicity of STLV-1 in the macaques.

List of Publications

- Murata M, Yasunaga J-i, Washizaki A, Seki Y, Kuramitsu M, TAN WK, Hu A, Okuma K, Hamaguchi I, Mizukami T, Matsuoka M, Akari H: Frequent horizontal and mother-to-child transmission may contribute to high prevalence of STLV-1 infection in Japanese macaques. **Retrovirology** 17, 15, 2020.
- Izaki M, Yasunaga J-i, Nosaka K, Sugata K, Utsunomiya H, Suehiro Y, Shichijo T, Yamada A, Sugawara Y, Hibi T, Inomata Y, Akari H, Melamed A, Bangham C, Matsuoka M: In vivo dynamics and adaptation of HTLV-1-infected clones under different clinical conditions. **PLoS Pathogens** 17 (2): e1009271, 2021.
- Matsuoka S, Kuwata T, Ishii H, Sekizuka T, Kuroda M, Sano M, Takeda A, Okazaki M, Yamamoto H, Shimizu M, Matsushita S, Seki Y, Saito A, Sakawaki H, Hirsch MV, Miura T, Akari H, Matano T: A potent anti-simian immunodeficiency virus neutralizing antibody induction associated with a germline immunoglobulin gene polymorphism in rhesus macaques. **Journal of Virology**, 2021. Online ahead of print. Jan 13:JVI.02455-20.
- Iwamoto Y, Seki Y, Taya K, Tanaka M, Iriguchi S, Miyake Y, Nakayama EE, Miura T, Shioda T, Akari A, Takaori -Kondo A, Kaneko S: Generation of macrophage with altered viral sensitivity from genome-edited rhesus macaque iPSCs to model human disease. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, accepted, 2021.
- Anastasiia Kovba、鷺崎彩夏、明里 宏文：実験用霊長類を用いた新規 HIV 感染モデルの樹立. オベリスク 26, 12-19, 2021.

明里宏文：感染症動物モデルー霊長類モデルを中心に. パンデミック時代の感染症研究 . 実験医学
増刊 39, 102-106, 2021.

List of Presentations

鷺崎彩夏、明里宏文：HIV 感染症の根治に向けて：霊長類モデルの意義. 第 34 回日本エイズ学会
学術集会（シンポジウム講演）. 2020 年 11 月 27 日、オンライン開催

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。2020年においては、内在性ウイルスに由来するRNAシスエレメントSPREのゲノム解析ならびに機能解析をおこなった。また、ベトナムに生息するイエネコとヤマネコに由来するネコフォーミーウィルスをモデルに非病原性ウイルスと宿主の共進化に関する研究をおこなった。

1) 内在性レトロウイルス由来 RNA エレメント SPRE の解析

レトロウイルスは、効率的なウイルス複製のために遺伝子発現を制御するRNAエレメントを保持しているが、数千万年前の古代レトロウイルスにおけるRNAエレメントの働きは明らかでない。我々は以前、内在性レトロウイルス(ERV)に由来する*syncytin-1*遺伝子のmRNAにおいて遺伝子発現エンハンサーとして機能するSPREと呼ばれるRNAエレメントを同定している。本年度の研究では、このSPREが系統的に離れた複数のERVグループで共有されている転写後制御エレメントであり、3つの保存された配列モチーフから構成されていることを発見した。配列解析の結果、SPREは現存のウイルス配列からは見つからないことから、SPREは古代レトロウイルスに特有のものであることが示唆された。SPREは鳥類ゲノムでは検出されなかった一方、ほぼすべての哺乳類ゲノムから検出され、そのコピー数は、種間で1～数千と大きく異なっていた。これは一群の「SPREレトロウイルス」による哺乳類ゲノムへの侵入が異なる宿主系統で独立に何度も起きてきたことを示している。古代レトロウイルスが現存のレトロウイルスとは異なる未知のRNAエレメントを宿主ゲノムに残してきたという知見は、ERV由来の転写後制御RNAエレメントがプロモーターやエンハンサーのように宿主ゲノムにおける潜在的な制御配列である可能性を示唆する。

2) ベンガルヤマネコ由来ネコフォーミーウィルスの遺伝学的系統解析と分子クローンの作製

フォーミーウィルスは、サル、ウシ、ウマ、ネコなどの哺乳類から単離されている非病原性のレトロウイルスであり、それぞれの宿主と共に種分化をおこしている。しかし、例外的にネコフォーミーウィルス(FFV)はイエネコから野生のネコ科動物への種間伝播が確認されている。今回我々は、ベトナムで採取されたベンガルヤマネコ由来のFFVの遺伝子配列を解析した。その結果、イエ

ネコとベンガルヤマネコのFFVは非常に近縁であった。さらに、膜タンパク質のEnvと宿主の抗ウイルス因子阻害タンパク質のBetは宿主への適応に重要であると考えられるが、これらのタンパク質のアミノ酸配列相同率はそれぞれのFFVの97%以上でありベンガルヤマネコ特異的な変異は存在しなかった。また、性状をより詳しく解析するため、ベンガルヤマネコ由来FFVの配列から感染性分子クローンを作製した。このクローン由来のFFVはイエネコ細胞においても効率的に複製した。この結果から、ネコフォーミーウィルスは新しい宿主への適応進化を遂げないままに種間伝播をおこしていることが示された。また、未だFFVの感染が確認されていない他の野生ネコ科動物への種間伝播危険性が示された。

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 2020, we conducted the comprehensive, functional analysis of an RNA element, SPRE, derived from mammalian endogenous retroviruses. Also, we studied feline foamy viruses from the domestic and wild cats in Vietnam as a model of the evolution of non-pathogenic viruses and their hosts.

1) Analysis of the endogenous retrovirus-derived RNA element, SPRE

Retroviruses utilize multiple cis-acting RNA elements for efficient viral replication, but it is not clear how they are in ancient retroviruses tens of millions of years old. It is also uncertain whether such retroviral RNA elements are incorporated into host genomes as endogenous retroviruses (ERVs), which were inserted into the host genomes by germ cell infection. We have recently found that an RNA element called SPRE, which is originally identified in ERV-derived syncytin-1 mRNA as a gene expression enhancer, is a post-transcriptional regulatory element shared in distinct mammalian ERV families and consisting of three conserved sequence motifs. Sequence analyses defined that the SPRE-like elements were not observed in currently prevailing retroviruses, suggesting that this element is unique to the ancient retroviruses. The SPRE-like elements were detected in almost all mammalian genomes but not in bird genomes. Their copy numbers in genomes varied widely among host species from one to several thousand, suggesting the multiple and independent invasions of “SPRE-harboring retroviruses” into mammalian genomes. These findings will also provide the new implication that ERVs are sources of hidden RNA elements, and they may be potential regulatory elements in host genomes like ERV-derived promoters or enhancers.

2) Genetic analysis of feline foamy viruses isolated from leopard cats in Vietnam and construction of the molecular infectious clone

Foamy viruses are non-pathogenic retroviruses that have been isolated from various mammals including monkeys, cows, horses, and cats, and they co-specify with their respective hosts. However, the frequent

cross-species transmission has been reported in feline foamy viruses (FFVs) from domestic cats to wild cats. In this study, we analyzed sequences of FFVs isolated from leopard cats in Vietnam. The results showed that the FFVs from domestic cats and leopard cats were very closely related. Furthermore, comparisons of the amino acid sequences of the Env and Bet proteins, which are both related to the host specificity, showed more than 97% similarity in these proteins and no specific amino acid substitutions between FFVs from domestic and wild cats. To analyze the biological characteristics, an infectious molecular clone was constructed from FFV derived from a leopard cat. The clone-derived FFV replicated efficiently in domestic cats' cells. These results indicate that FFVs have not evolved to adapt to the wild cats from the domestic cats and suggest that the risk of cross-species transmission to other wild felines in which FFV infection has not yet been confirmed was demonstrated.

List of Publications

- Hashimoto-Gotoh, A., Kitao, K., & Miyazawa, T. (2020). Persistent infection of simian foamy virus derived from the Japanese macaque leads to the high-level expression of microRNA that resembles the miR-1 microRNA precursor family. **Microbes and Environments**, 35 (1), ME19130.
- Hashimoto-Gotoh, A., Yoshikawa, R., Nakagawa, S., Okamoto, M., & Miyazawa, T. (2020). Phylogenetic analyses reveal that simian foamy virus isolated from Japanese Yakushima macaques (*Macaca fuscata yakui*) is distinct from most of Japanese Hondo macaques (*Macaca fuscata fuscata*). **Gene**, 734, 144382.
- Nakagawa, S., & Miyazawa, T. (2020). Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics. **Inflammation and Regeneration**, 40, 17.
- 宮沢孝幸 中川草 新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の比較ウイルス学と比較ゲノム解析 実験医学 38 (8), 1338-1347.
- 藤井聰、宮沢孝幸、高野裕久、桑原篤憲、清野純史、矢守克也、柴山桂太、大西正光、山田忠史、川端祐一郎、中尾聰史 国民被害の最小化を企図した新型コロナウイルス対策における基本方針の提案 実践政策学 6 (1), 203-108.
- 宮沢孝幸 新興ウイルス感染症とは何か？COVID-19を正しく恐れよ 藤井聰、宮沢孝幸（編著） 公衆免疫強化論 管政権への提言（啓文社書房），55-88.
- 宮沢孝幸 新型コロナウイルスは社会構造の進化をもたらすのか 思想としての<新型コロナウイルス禍>（河出書房新社）
- 宮沢孝幸 経済活動は「1／100作戦」で守れる Voice 編集部（編集） 変質する世界 ウィズコロナの経済と社会（PHP研究所）
- 武村政春、宮沢孝幸（監修） ずかん ウィルス（技術評論社）

List of Presentations

- 宮沢孝幸 比較コロナウイルス学からのアプローチ 第119回日本皮膚科学会 新型コロナウイルス感染症対策緊急シンポジウム、オンライン、2020年6月5日（招待講演）
- 宮沢孝幸 新型コロナウイルスはどんなもの？ 第12回土木と学校教育フォーラム、オンライン、2020年8月23日（招待講演）
- 宮沢孝幸 新型コロナウイルスの性質とウイルス学的感染回避方法 日本行動計量学会第48回大会、オンライン、2020年9月2日（招待講演）
- 麻生志郎、宮沢孝幸 ネコフォーミーウィルス由来 miRNA の同定及び遺伝子発現抑制機能の探索 2020年環境ウイルス研究集会、オンライン、2020年9月4日
- 住吉葵、宮沢孝幸 ベンガルヤマネコ由来ネコフォーミーウィルスの遺伝学的性状解析 2020年環境ウイルス研究集会、オンライン、2020年9月4日
- 宮沢孝幸 新型コロナウイルス：比較ウイルス学的見地から 2020年環境ウイルス研究集会、オンライン、2020年9月4日（招待講演）
- 麻生志郎、後藤暁、北尾晃一、宮沢孝幸 ネコフォーミーウィルス由来 miRNA の同定及び機能解析 第163回日本獣医学会学術集会、オンライン、2020年9月8-10日
- 北尾晃一、宮沢孝幸 進化的に保存された内在性フォーミーウィルスの機能解析 第163回日本獣医学会学術集会、オンライン、2020年9月8-10日
- 住吉葵、北尾晃一、宮沢孝幸 ベンガルヤマネコ由来ネコフォーミーウィルスの感染性分子クローニングの作製と遺伝学的性状解析 第163回日本獣医学会学術集会、オンライン、2020年9月8-10日
- 宮沢孝幸 今こそ知りたい！人と動物とウイルスは古代からのつきあい 日本臨床獣医学フォーラム第22回年次大会、オンライン、2020年9月20日（招待講演）
- 宮沢孝幸 レトロウイルスと宿主の共進化 西宮市ライフサイエンスセミナー、西宮市、2020年10月21日（招待講演）
- 宮沢孝幸 新型コロナウイルス感染防止対策と社会・経済活動の両立 公共交通機関のコロナ感染防止対策セミナー、国土交通省近畿運輸局、大阪市、2020年10月30日（招待講演）
- 宮沢孝幸 新型コロナウイルス感染拡大防止と社会・経済活動の両立について 大阪京大クラブ、大阪市、2020年11月10日（招待講演）
- 宮沢孝幸 100分の1作戦 新型コロナウイルスの時代を子どもたちと生き抜くために 九州思春期研究会、福岡市、2020年11月15日（招待講演）
- 宮沢孝幸 100分の1作戦 COVID-19の特徴と感染防止対策 日本赤十字看護大学、さいたま市、

2020年11月18日（招待講演）

宮沢孝幸 ウィルスと動物の共進化 ジュニアドクター育成塾「めばえ適塾」 吹田市、2020年11月29日（招待講演）

宮沢孝幸 新型コロナウィルスの性質と回避方法 京都商工会議所 京都市、2020年11月30日（招待講演）

宮沢孝幸 ウィルス感染症とどう向き合う？ 京都SKYシニア大学 京都市、2020年12月1日（招待講演）

麻生志郎、後藤暁、北尾晃一、宮沢孝幸 ネコフォーミーウィルス由来 miRNA の同定及び遺伝子発現抑制機能と標的遺伝子の探索 第43回日本分子生物学会、オンライン、2020年12月2-4日

北尾晃一、中川草、宮沢孝幸 ウィルス由来遺伝子 syncytin に着目した古代レトロウイルス転写後制御エレメントの探索 第43回日本分子生物学会、オンライン、2020年12月2-4日

住吉葵、宮沢孝幸 ベンガルヤマネコ由来ネコフォーミーウィルスの遺伝学的系統解析 第43回日本分子生物学会、オンライン、2020年12月2-4日

宮沢孝幸 ウィルス学の常識からみた COVID-19 東北大学災害科学国際研究所セミナー、オンライン、2020年12月8日（招待講演）

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、ホモマウス作製および胎生期解析用の受精卵準備も実施可能である。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

2018年	228 系統	52,601 個
2019年	248 系統	59,031 個
2020年	267 系統	44,428 個

2) トランスジェニックマウスの作製

	依頼数	使用胚数
2018年	21	8,773
2019年	30	12,554
2020年	2	938

3) 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
2018年	56	25,081
2019年	97	34,226
2020年	97	36,184

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

2018	228 strains	52,601 embryos
2019	248 strains	59,031 embryos
2020	228 strains	44,428 embryos

2) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of injected constructs	No of injected embryos
2018	21	8,773
2019	30	12,554
2020	2	938

3) CRISPR/Cas9

	Number of requests	Number of embryos used
2018	56	25,081
2019	97	34,226
2020	97	36,184

List of Publications

- Cui, G., Shimba, A., Ma, G., Takahara, K., Tani-Ichi, S., Zhu, Y., Asahi, T., Abe, A., Miyachi, H., Kitano, S., et al. (2020). IL-7R-Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Competes with the STAT5 Signal to Modulate T Cell Development and Homeostasis. *J. Immunol.* 204, 844-857.
- Imayoshi, I., Tabuchi, S., Matsumoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., Kageyama, R., and Yamanaka, A. (2020). Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in and BAC transgenic mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR3. *Sci Rep* 10, 3191.
- Ishibashi, R., Abe, K., Ido, N., Kitano, S., Miyachi, H., and Toyoshima, F. (2020). Genome editing with the donor plasmid equipped with synthetic crRNA-target sequence. *Sci Rep* 10, 14120.
- Kuroki, S., Maeda, R., Yano, M., Kitano, S., Miyachi, H., Fukuda, M., Shinkai, Y., and Tachibana, M. (2020). H3K9 Demethylases JMJD1A and JMJD1B Control Prospermatogonia to Spermatogonia Transition in Mouse Germline. *Stem Cell Reports* 15, 424-438.
- Ochi, S., Imaizumi, Y., Shimojo, H., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2020). Oscillatory expression of Hes1 regulates cell proliferation and neuronal differentiation in the embryonic brain. *Development* 147.
- Tani-Ichi, S., Wagatsuma, K., Hara, T., Cui, G., Abe, S., Miyachi, H., Kitano, S., and Ikuta, K. (2020). Innate-like CD27. *J Immunol* 204, 2671-2684.

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；111 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。

また研究支援として遺伝子改変・ゲノム編集マウスの作出を行っている。我々は、“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきたが、近年、TALEN や CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いた簡易な遺伝子破壊・遺伝子挿入マウス作出技術が開発された。当施設でもこれらを積極的に取り入れ、本年は 40 件以上の遺伝子改変・ゲノム編集マウスの作製に携わった。

Experimental animals, such as mouse 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 40 gene-manipulated mouse strains in this year.

List of Publications

Takeuchi Y, **Hirota K**, Sakaguchi S. Impaired T cell receptor signaling and development of T cell-mediated autoimmune arthritis. *Immunol Rev.* 294 (1):164-176 (2020).

Ikeno Y, Ohara D, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Taura K, Uemoto S, **Hirota K**. Foxp3+ Regulatory T Cells Inhibit CCl4-Induced Liver Inflammation and Fibrosis by Regulating Tissue Cellular Immunity. *Front Immunol.* 15;11:584048 (2020).

Das N.R., Miyata H., Hara H., Chida J., Uchiyama K., Masujin K., **Watanabe H.**, **Kondoh G.**, and Sakaguchi S. The N-Terminal Polybasic Region of Prion Protein Is Crucial in Prion Pathogenesis Independently of

the Octapeptide Repeat Region. *Mol Neurobiol.* Feb;57 (2):1203-1216 (2020).

Nakao, S., Takeo, T., **Watanabe, H.**, **Kondoh, G.**, Nakagata, N. Successful selection of mouse sperm with high viability and fertility using microfluidics chip cell sorter. *Scientific Reports*, 10-1: 8862 (2020).

Miyazaki, K., **Watanabe, H.**, Yoshikawa, G., Chen, K., Hidaka, R., Aitani, Y., Osawa, K., Takeda, R., Ochi, Y., Tani-ichi, S., Uehata, T., Takeuchi, O., Ikuta, K., Ogawa, S., **Kondoh, G.**, Lin, Y. C., Ogata, H., and Miyazaki, M. The transcription factor E2A activates multiple enhancers that drive Rag expression in developing T and B cells. *Science Immunology*, 5 (1455) (2020).

Uchiyama, K., Miyata, H., Yamaguchi, Y., Imamura, M., Okazaki, M., Agriani Dini Pasiana, Chida, J., Hara, H., Atarashi, R., **Watanabe, H.**, **Kondoh, G.** and Sakaguchi, S. Strain-Dependent Prion Infection in Mice Expressing Prion Protein with Deletion of Central Residues 91-106. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (19), 7260; <https://doi.org/10.3390/ijms21197260> (2020).

Hirotsune, S., Kiyonari, H., Jin, M., Kumamoto, K., Yoshida, K., Shinohara, M., **Watanabe, H.**, Wynshaw-Boris, A., and Matsuzaki, F. Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends. *Scientific Reports* 10:2518 (2020).

Nakato, M., Shiranaga, N., Tomioka, M., **Watanabe, H.**, Kurisu, J., Kengaku, M., Komura, N., Ando, H., Kimura, Y., Kioka, N., and Ueda, K. ABCA13 dysfunction associated with psychiatric disorders causes impaired cholesterol trafficking. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbcRA120.015997> (2020).

廣田圭司 「Pathogenic ヘルパー T 細胞と組織炎症」: 医学のあゆみ、医歯薬出版株式会社 274 卷 12 号 1214-9、2020 年 9 月 19 発行

廣田圭司 「Th17 細胞による関節炎惹起と慢性炎症の維持機構」: リウマチ科、科学評論社 63 卷 6 号 603-609、2020 年 6 月 28 発行

List of Presentations

廣田圭司: 自己免疫性関節炎の滑膜組織炎症における炎症性細胞サブセットの役割、第 38 回日本骨代謝学会学術集会、2020 年 10 月 9-11 日

附属ヒトES細胞研究センター
Center for Human ES Cell Research

臨床基盤分野
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

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。

1) ヒトES細胞株の樹立と臨床応用を目指した基盤研究

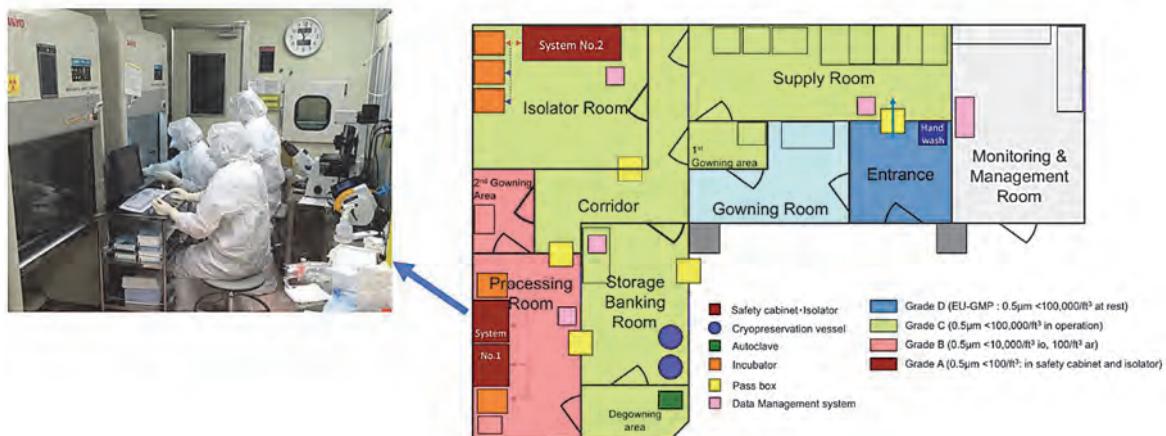
ヒトES細胞株、ヒトiPS細胞株などのヒト多能性幹細胞株は、創薬や細胞治療に有用な細胞リソースとして期待されている。これまでに樹立したヒトES細胞株は50件以上の研究計画に対して分配され多くの研究成果が上げられている。これらの成果を実際の臨床利用に展開する上で、必要となる多能性幹細胞の効率的な拡大培養法の開発などを行い、その成果はヒトES/iPS細胞の利用において国内で広く活用されている。

ES細胞の最大の特徴はその多能性にあるが、近年ナイーブ型とプライム型の2種類の多能性状態があり培養環境などに応じてこの2つの状態を行き来することが明らかにされている。ナイーブ型はプライム型に比べより発生初期の多能性細胞に近い性質を持つと考えられているが、これらの状態がどのように相互に移行するのかは明らかでなかった。我々はNR5A1遺伝子を強制発現させることでナイーブ/プライムの中間に相当する状態に安定することを見出した。この成果はこの2状態間の移行の分子メカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

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

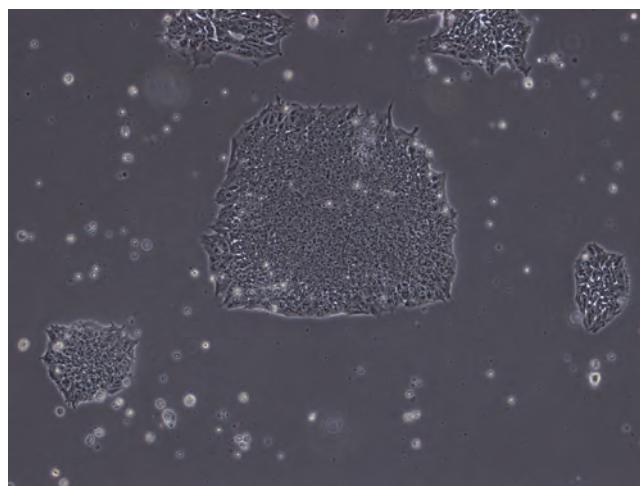
ヒトES細胞樹立指針や再生医療関連の法律の整備により、ヒトES細胞の臨床利用に向けての制度が整えられた。これらに対応して、新たに医薬品GMPレベルでのヒトES細胞株の樹立を行うための準備を進めてきた。臨床研究に使用するヒトES細胞は再生医療等の安全性の確保等に関する法律に基づき、特定細胞加工物製造許可を得た施設で作製する必要がある。本施設はその許可を得ており、ヒトES細胞の樹立施設としては唯一のものである。

Cell Processing Facility for clinical-grade human ES cells



この施設を用いて2017年6月より臨床用ES細胞の樹立を開始し、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。2020年12月までに5株のヒトES細胞の作製し分配を行なっている。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。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。

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。



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 research 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 research. 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 research projects.

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 5 cell lines, by December 2020. 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. (2020) Overexpression of nuclear receptor 5A1 induces and maintains an intermediate state of conversion between primed and naive pluripotency. **Stem Cell Reports.** 14, 3, 506-519

Kawase, E., Takada K., Suemori, H. (2020). Kyoto hESC cell resource for regenerative medicine. **Stem Cell Research** 49, 102020.

List of Presentations

川瀬栄八郎、高田圭、中谷良子、森部江美子、末盛博文：京都大学ウイルス・再生医科学研究所に

における臨床用ヒト ES 細胞株の樹立、ストック作製とその評価系の構築 第 19 回日本再生医療
学会総会、横浜、2020 年 3 月 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

ウイルス再生医科学研究所は、公式 WEB サイトから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ている。

今年度は新型コロナの流行により Zoom にて新所員対象ネットワークセキュリティ講習会を開催した。また昨年からの懸案事項であった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を収集し、不要な機器及び VLAN の整理を行った。

研究所ネットワーク管理に加えて、竹本は次世代シーケンサーのデータ解析を行っている。ヒト及びマウス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、LINE の 5'UTR に存在するアンチセンスプロモーターをターゲットとしたガイド RNA と CRISPR-dCas9-VP64 による強制的活性化の実験データを解析し、L1 のアンチセンスプロモーターが活性化すると細胞増殖 / 細胞周期に関する遺伝子に変化が見られることを報告した。

Institute for Frontier Life and Medical Sciences LAN system (Infront-LAN) has administrated by the information security committee consisted of three staffs (Prof. Koyanagi, 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. This year, due to the outbreak of the COVID-19, we held a network security seminar for new employees via Zoom. We also collected a list of network devices and wireless access points for all laboratories of the Institute, which had been a pending issue since last year, and organized unnecessary devices and VLANs. 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 has studied the effects of LINE-1 antisense promoter (L1 ASP) which located in the L1 5' untranslated region and acts in the opposite direction. We stimulated L1 ASP activity using CRISPR-Cas9 technology to evaluate its biological impacts. Activation of the L1 ASP upregulated the expression of L1 ASP-driven ORF0 and promoted cell proliferation.

List of Publications

Honda, T., Nishikawa, Y., Nishimura, K., Da Teng, Takemoto, K. and Ueda, K. (2020). Effects of activation of the LINE-1 antisense promoter on the growth of cultured cells. **Sci Rep.** 10, 22136. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79197-y>

共同研究

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2019年度共同研究報告（研究期間：2019年4月～2020年3月）

【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】

- 研究代表者 京都大学大学院医学研究科 竹内 理 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

本研究課題は、RNA 分解酵素である Regnase-1 (Reg1) とそのファミリー分子である Regnase-3 (Reg3) に着目し、骨髓造血におけるリンパ球-ミエロイド分化運命決定を制御する mRNA 安定性調節機構の解明を目的とした。これまでに、Reg1 と Reg3 の二重欠損マウスの表現型解析から、Reg1 と Reg3 がリンパ球分化に重要な役割を有していることがわかつていたが、その分子機構の詳細は明らかではなかった。申請者らは Reg1 と Reg3 が、リンパ球前駆細胞よりも上流の多能性分化細胞においてリンパ球とミエロイド分化の運命に深く関与することを見出した。具体的には、Reg1 と Reg3 の二重欠損マウスは周産期死亡に陥るため、近藤教授により体外受精を用いた胎仔肝細胞移植マウスを作製し解析を行った。特に、造血幹細胞に焦点をあて single-cell RNA シークエンス解析の結果により、*Reg1/Reg3* 二重欠損細胞では、野生型に比しリンパ球系細胞の減少とミエロイド系細胞の増加が認められ、これは 1 細胞遺伝子発現においても *Reg1/Reg3* 二重欠損細胞ではリンパ球系遺伝子の発現低下及びミエロイド系遺伝子の発現上昇として認められた。これらの解析により、Reg1/Reg3 によって制御される遺伝子として *Nfkbia* を同定した。これまでマクロファージでは、*Nfkbia* は転写制御因子として IL-6 の発現を正に制御するとされていたが、骨髓造血幹細胞におけるミエロイド分化における役割は明らかではなかった。そこで、*Reg1^{fl/fl}Reg3^{null}* マウスから樹立したリンパ球系前駆細胞株を樹立することにより、Reg1/Reg3 によるリンパ球分化制御メカニズムを解析した。この細胞株は Reg3 単独欠損ではリンパ球分化障害を認めないが、Cre タンパク質を発現誘導することにより Reg1 を欠損させると、マウス表現型と同様、リンパ球分化障害が認められた。リンパ球系前駆細胞株において、Reg1 と Reg3 は *Nfkbia* mRNA と結合することに加え、二重欠損細胞では *Nfkbia* 発現が蛋白レベルでも著しく増加することが明らかとなった。さらに、*Nfkbia* 強制発現系において、野生型の細胞株では B 細胞分化の障害に加え、CD11b 陽性のミエロイド系細胞の分化が認められた。このことから Reg1/Reg3-Nfkbia 制御軸が骨髓造血幹細胞におけるリンパ球-ミエロイド分化の運命制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上、本共同研究により解析困難な致死性二重欠損マウスに対して、近藤教授による胚移植技術により飛躍的に解析速度が増し多くの研究成果が得られた。以上の研究成果は、現在論文化に向け投稿準備中である。

- 研究成果の公表
(学会発表)

1. 17th International Congress of Immunology, 2019/10/19-23, Critical roles of endonucleases Regnase-1

- and Regnase-3 in early lymphopoiesis, T. Uehata, *oral presentation*.
2. CiRA 2019 International Symposium 2019/11/27-29, Endonucleases Regnase-1 and Regnase-3 regulate transcriptome biases to ensure lymphopoiesis, T. Uehata, *poster presentation*.
 3. 第42回日本分子生物学会年会 2019/12/3-6、免疫細胞を制御する RNA 結合タンパク質の機能解析、植畠拓也、口頭発表

【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】

- 研究代表者 京都府立医科大学医学研究科 八木田 和弘 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

概日時計は、視床下部の視交叉上核に中枢が存在し、地球の自転周期に生体機能を適応させる役割を担う。一方で、視交叉上核のみならず全身の細胞に概日時計が備わっており、約24時間周期のリズムを刻んでいるが、全身の細胞レベルで概日時計が備わっている意義は未だに十分に理解されていない。我々は、これまでにマウスES細胞を用いた解析から、概日時計の成立が、細胞分化と共に役割関係にあることを明らかにした（Yagitaら、PNAS, 2010; Umemuraら、PNAS, 2014）。マウスの個体発生においても、細胞分化と共に役割した概日時計の形成がみられ、組織形成や個体発生との関連が示唆される（Umemuraら、PNAS, 2017）。本共同研究では、細胞分化と概日時計の共役関係がもつ細胞生物学的意義について明らかにすることを目的とした。

本共同研究では、これまで申請者が進めてきた、概日時計と細胞分化の共役関係を担う遺伝子群に注目した（Umemuraら、PNAS, 2017）。この遺伝子セットは、驚くべきことに、ヒトの様々なガンの予後と相關することがわかった（投稿準備中）。さらに、興味深いことに、GSEA解析から、これらの遺伝子群を up-regulate するマスター遺伝子が存在することがわかった。これらのことから、このマスター遺伝子について、概日時計形成の破綻と腫瘍形成を引き起こすのか解析を進めた。

まず、このマスター遺伝子をドキシサイクリン依存的に発現誘導できるES細胞を樹立した。In vitroで、このES細胞を分化誘導し、概日時計を形成させた。その結果、マスター遺伝子の発現依存的に、概日時計の形成破綻が引き起こされることがわかった。さらに、in vivoで、これらのマスター遺伝子が、概日時計形成の破綻と同時に、腫瘍形成を引き起こすのか解析を進めた。そのために、近藤玄教授との本共同研究で、このマスター遺伝子をドキシサイクリン依存的に発現誘導するES細胞を用いて、キメラマウスの作製をした。ドキシサイクリンによって、生体内でこれらマスター遺伝子の発現誘導を行った。腫瘍形成を中心とした病理学的な解析と、概日時計については、時計遺伝子の発現をリアルタイムにモニターできるルシフェラーゼレポーターを導入しておき、概日時計の機能的評価を行った。腎臓を主に解析した結果、これらのマスター遺伝子の発現誘導をした時にのみ、概日時計形成の破綻と、腫瘍形成が引き起こされる可能性があることが示唆された（投稿準備中）。さらに、これらの網羅的な遺伝子発現解析も含めて、進める予定である。これにより、時間情報の創出にとどまらない、概日時計の細胞生物学的意義の新たな側面を明らかにする。

○研究成果の公表

(発表論文)

1. Tsuchiya Y, Umemura Y, Yagita K*. Circadian clock and cancer: From a viewpoint of cellular differentiation. *Int J Urol.* 2020 Mar 28.
2. Inokawa H, Umemura Y, Shimba A, Kawakami E, Koike N, Tsuchiya Y, Ohashi M, Minami Y, Cui G, Asahi T, Ono R, Sasawaki Y, Konishi E, Yoo SH, Chen Z, Teramukai S, Ikuta K, Yagita K*. Chronic circadian misalignment accelerates immune senescence and abbreviates lifespan in mice. *Sci Rep.* 2020 Feb 13;10 (1):2569.
3. Ono R, Koike N, Inokawa H, Tsuchiya Y, Umemura Y, Yamamoto T, Kanamura N, Yagita K. Incremental Growth Lines in Mouse Molar Dentin Represent 8-hr Ultradian Rhythm. *Acta Histochem Cytochem.* 2019 Dec 27;52 (6):93-99. doi: 10.1267/ahc.19017. Epub 2019 Dec 20.
4. Umemura Y, Yagita K*. Development of the Circadian Core Machinery in Mammals. *J Mol Biol.* 2020 Jan 10. pii: S0022-2836 (20) 30035-8.
5. Inoue M, Tsuchiya Y, Koike N, Umemura Y, Inokawa H, Togashi Y, Maniwa J, Higashi M, Fumino S, Tajiri T, Yagita K. Enhanced metastatic growth after local tumor resection in the presence of synchronous metastasis in a mouse allograft model of neuroblastoma. *Pediatr Surg Int.* 2019 Dec;35 (12):1403-1411.
6. Umemura Y, Maki I, Tsuchiya Y, Koike N, Yagita K*. Human Circadian Molecular Oscillation Development Using Induced Pluripotent Stem Cells. *J Biol Rhythms.* 2019 Aug 1:748730419865436.
7. Ikeda R, Tsuchiya Y, Koike N, Umemura Y, Inokawa H, Ono R, Inoue M, Sasawaki Y, Grieten T, Okubo N, Ikoma K, Fujiwara H, Kubo T, Yagita K*. REV-ERB α and REV-ERB β function as key factors regulating Mammalian Circadian Output. *Sci Rep.* 2019 Jul 15;9 (1):10171.
8. Doi M, Shimatani H, Atobe Y, Murai I, Hayashi H, Takahashi Y, Fustin JM, Yamaguchi Y, Kiyonari H, Koike N, Yagita K, Lee C, Abe M, Sakimura K, Okamura H. Non-coding cis-element of Period2 is essential for maintaining organismal circadian behaviour and body temperature rhythmicity. *Nat Commun.* 2019 Jun 12;10 (1):2563.
9. Oshima T, Niwa Y, Kuwata K, Srivastava A, Hyoda T, Tsuchiya Y, Kumagai M, Tsuyuguchi M, Tamaru T, Sugiyama A, Ono N, Zolboot N, Aikawa Y, Oishi S, Nonami A, Arai F, Hagihara S, Yamaguchi J, Tama F, Kunisaki Y, Yagita K, Ikeda M, Kinoshita T, Kay SA, Itami K, Hirota T. Cell-based screen identifies a new potent and highly selective CK2 inhibitor for modulation of circadian rhythms and cancer cell growth. *Sci Adv.* 2019 Jan 23;5 (1):eaau9060.

(学会発表)

【海外】

1. Yagita K., Developmental Program and Environmental Reprogram of Mammalian Circadian Regulation System., *European Biological Rhythms Society Congress 2019*, Lyon, Aug 28, 2019
2. Yagita K., Developmental Program and Environmental Reprogramming of the Mammalian Circadian System., *Advance in Sleep and Circadian Science*, Clearwater Beach Florida, Feb. 2, 2019

【国内】

1. 八木田和弘：「体内時計はいつ形成されるか？」, 第7回新胎児学研究会, 高松, Nov. 2, 2019

(特別講演)

2. 八木田和弘:「概日リズムと老化」, 第 34 回老化促進モデルマウス (SAM) 学会学術集会, 高松, July 13, 2019 (特別講演)
3. 八木田和弘:「長期にわたる概日リズム搅乱による免疫恒常性破綻」, 第 44 回日本睡眠学会学術集会, 名古屋, Jun. 28, 2019 (シンポジスト)
4. 八木田和弘:「体内時計はいつ形成されるか?」, 第 61 回日本小児神経学会学術集会, 名古屋, Jun. 1, 2019 (教育講演)

【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】

○研究代表者 早稲田大学理工学術院 小出 隆規 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 細胞機能調節学分野 平芳 一法 講師

○研究経過及び研究成果

先行研究において、コラーゲンに結合する RNA アプタマーのスクリーニングを Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) 法によって実施した結果、約 40 種類のクローンを得ることができた。しかし、得られたいいくつかのクローンについてコラーゲン結合能を評価したところ、それらの親和性は弱かった。

本研究では、RNA アプタマーの標的として天然コラーゲンを使用する代わりに、コラーゲンの 3 重らせん構造を模倣し、タンパク質と相互作用するアミノ酸配列を有する化学合成ペプチド (= 3 重らせんペプチド、分子量約 9,000) をもちいた。ここでは、コラーゲン結合タンパク質であるインテグリン $\alpha 2\beta 1$ あるいは色素上皮由来因子への結合配列である Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg あるいは Lys-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu を含む 3 重らせんペプチドを標的としてそれぞれ選択した。SELEX 法によって、80 ヌクレオチドのランダム領域を含む RNA ライブライアから本ペプチドに結合する RNA アプタマーのスクリーニングを行った。各ペプチドに対するスクリーニングで得られた大腸菌のコロニーから約 20 個を選択し、それらのランダム領域の配列を DNA シークエンサーによって同定した。その結果、それぞれのスクリーニングにおいて特定の核酸配列が濃縮される結果を得た。Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg 配列を有するペプチドに対するスクリーニングでは、24 個の配列の内 5 個が同一であった。Lys-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu 配列を有するペプチドに対するスクリーニングでは、23 個の配列の内 7 個、6 個、5 個がそれぞれ同じものであった。この結果は、それぞれの 3 重らせんペプチドに対して結合する RNA が SELEX 法によって濃縮されたことを示唆している。

今後は、濃縮された配列を有する RNA を調製し、それらの 3 重らせんペプチドおよびコラーゲンに対する結合をゲルシフトアッセイおよび表面プラズモン共鳴法によって評価する。

○研究成果公表

(学会発表)

法邑賢一、富永裕貴、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 2019 年 12 月 6 日 (マリンメッセ福岡)

[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 α 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ることができるようになった。カセット交換できたクローンにおいて、Puromycin 耐性遺伝子を欠失させたのち、T 細胞へと分化誘導させ、高いがん抗原特異的キラー活性を持つことを見出した。以上のようにして、ゲノム編集とカセット交換法を用いて、iPS 細胞からがん抗原特異的キラー T 細胞を効率よく再生する方法の確立に成功した（論文投稿準備中）。

○研究成果公表

(発表論文)

1. Kashima S, Maeda T, Masuda K, Nagano S, Inoue T, Takeda M, Kono Y, Kobayashi T, Saito S, Higuchi T, Ichise H, Kobayashi Y, Iwaisako K, Terada K, Agata Y, Nakamura K, Saito M, Narita S, Ogawa O, Habuchi T, Kawamoto H. Cytotoxic T lymphocytes regenerated from iPS cells have therapeutic efficacy in a patient-derived xenograft solid tumor model. **iScience** 2020 In press.
2. Nagasawa M, Tomimatsu K, Terada K, Kondo K, Miyazaki K, Miyazaki M, Motooka D, Okuzaki D, Yoshida T, Kageyama S, Kawamoto H, Kawauchi A, Agata Y. Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer. **Biochem Biophys Res Commun.** 2020 Mar 18 doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.043.

(学会発表)

1. 永野誠治、寺田晃士、近藤遼平、縣 保年、増田喬子、河本 宏. Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method. 第 48 回 日本免疫学会総会 (2019 年 12 月 11-13 日, 浜松)
2. 寺田晃士、近藤遼平、永野誠治、増田喬子、河本 宏、縣 保年. Development of an efficient

- method to introduce TCR genes into the endogenous TCR locus by genome editing and cassette exchange. 第48回日本免疫学会総会（2019年12月11-13日，浜松）
3. 縣 保年. iPS細胞から再生したT細胞とカニクイザルを用いたがん免疫療法の開発. 多様な新ニーズに対応する「がん専門医療人材（がんプロフェッショナル）」養成プラン 令和元年度「5大学連携医療フォーラム」（2019年9月20日，京都）

【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】

- 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 生体材料学分野 城 潤一郎 助教
○研究経過及び研究成果

幹細胞凝集体の深部へ様々な分子を送達できる分子デリバリーシステムを開発することを目的として、研究期間に次の点について検討した。すなわち、組織浸透性を有するスルホベタインポリマーを用いて、その細胞凝集体内における動態について、高速共焦点顕微鏡や共焦点ラマン顕微鏡を用いた分子イメージング解析を行った。研究期間を通じて、組織浸透性ポリマーに共有結合を介して結合させた分子が細胞凝集体内部に分布することを確認した。また、ヒトグリオblastoma由来細胞株からなる細胞凝集体に対し、分子デリバリーシステムを用いて抗がん剤の一つであるゲルダナマイシン誘導体（17-AAG）を作用させたところ、17-AAG単独と比較して、低濃度で細胞増殖抑制効果を示すことを見いだした。2020年度共同研究では、幹細胞を利用して組織浸透性機構について検討を進める予定である。以下に、研究期間に得られた研究成果について述べる。

われわれは、分子デリバリーシステムとして、正負の荷電基を1つの側鎖に有する、スルホベタインを主成分としたコポリマー Poly[3-dimethyl (methacryloyloxyethyl) ammonium propane sulfonate-*co*-poly (ethyleneglycol) methacrylate], P (DMAPS-PEGMA) を合成した。さらに、得られた分子デリバリーシステムが、单層培養した複数種類のがん細胞に対し、細胞毒性を示さないこと、膜透過と考えられる機構により細胞内へ速やかに移行すること、さらにドキソルビシン (DOX) とコンジュゲートすることにより抗がん活性を示すことを見いだした。本研究では、ヒトグリオblastoma由来細胞株(A-172)からなる平均直径約 300 μm の細胞凝集体内への DOX 修飾 P(DMAPS-PEGMA) の移行挙動について、共焦点レーザー顕微鏡、ならびに高速共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、分子デリバリーシステムは、曝露 10 分後には細胞凝集体の外郭に存在する細胞内に移行し、曝露 60 分後には細胞凝集体内部にも移行することがわかった。さらに、時間経過とともに細胞凝集体内の蛍光強度が高くなり、移行量の増加が示唆された。一方、DOX 単独では、曝露 2 時間後においても、DOX は、細胞凝集体の外郭に存在する細胞内に留まっていた。2020年度共同研究では、分子デリバリーシステムの組織浸透性機構について、幹細胞凝集体を利用して、細胞間結合や細胞外マトリックスなどの影響を含めて検討する予定である。

次に、抗がん剤として 17-AAG を用いて、A-172 からなる細胞凝集体の細胞増殖抑制効果について検討した。その結果、分子デリバリーシステムに化学結合させた 17-AAG は、17-AAG 単独と比

較して、10分の1の低濃度で細胞増殖抑制効果を示した。さらに、マトリゲル内にA-172からなる細胞凝集体を包埋することによって、細胞浸潤性を評価した。その結果、包埋3日後の浸潤面積は、17-AAG単独と比較して、約10分の1程度に抑制された。これらの結果は、分子デリバリーシステムが細胞凝集体内部へ浸透し、到達した細胞内で作用していることを示唆している。

尚、上記の研究成果について、現在、論文投稿準備中である。

○研究成果公表

(発表論文)

N. Morimoto, Y. Oishi, M. Yamamoto, The Design of Sulfobetaine Polymers with Thermoresponsiveness under Physiological Salt Conditions, *Macromol. Chem. Phys.*, **221**, 1900429 (2020).

【細胞動態と薬剤作用機序に基づく骨粗鬆症効果の数理解析】

○研究代表者 東京大学大学院医学系研究科 田中 栄 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授

○研究経過及び研究成果

骨粗鬆症治療の効果を解析するためには骨密度だけでなく骨質の評価が重要である。しかしながら複雑な骨代謝調節系と多様な薬剤作用機序のため、各骨粗鬆症治療薬の骨質に対する効果については自明ではない。本研究では、細胞動態および薬剤作用機序に基づいて骨代謝・治療数理モデルを構築し、骨粗鬆症治療における骨強度評価を細胞動態に基づき理解・予測可能な技術を創成することを目的としている。本研究ではまず、主要な骨代謝関連シグナル分子、力学刺激、および、破骨細胞と骨芽細胞のカップリング因子の挙動を連成させることで、破骨細胞と骨芽細胞が共役した活動を示す細胞動態を数理モデル化した。次に、薬剤作用機序をモデル化することで骨粗鬆症治療薬の投与を表現可能な数理モデルへと拡張した。さらに、構築した数理モデルを用いた薬剤投与シミュレーションを実施した。この際、ブタ大腿骨から採取した骨試料のX線マイクロCT画像を取得し、イメージベースト有限要素モデルを構築して使用した。骨形成促進薬の投与シミュレーションを行った結果、破骨細胞と骨芽細胞のカップリングに依存したリモデリングと依存しないモデリングのそれぞれが薬剤特異的な調節を受けることによって、骨質を規定する構造特性と材料特性に対する薬剤効果に相違が生まれるメカニズムが示された。

○研究成果の公表

(学会発表)

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、2019年10月12日、神戸

【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】

○研究代表者 国立研究開発法人理化学研究所 真貝 洋一 主任研究員

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授

○研究経過及び研究成果

申請者が長年研究してきたヒストン H3 の 9 番目のリシン残基 (H3K9) をメチル化する酵素複合体 G9a/GLP は、H3K9 と DNA の 2 種類のメチル化を誘導することで標的遺伝子の発現を抑制する (Tachibana et al *EMBO J* 2008)。今回の計画では、マウス ES 細胞に於いて G9a/GLP によって抑制されている遺伝子に GFP レポーターをノックインしたレポーター細胞を用いて、この GFP レポーターの脱抑制を指標にして、遊佐博士の所で整備している CRISPR-Cas9/gRNA ライブラリーノックアウト系を用いたスクリーニングを実施し、G9a/GLP の上流・下流で働いている転写抑制因子の網羅的探索を行った。その結果、G9a, GLP を筆頭に、G9a/GLP と複合体を形成し G9a/GLP の転写抑制に寄与する因子や DNA メチル化を制御する因子、といった G9a/GLP の転写抑制に寄与することが分かっている因子だけでなく、これまでその関係性が知られていなかった因子を複数同定した。現在、これら新規に同定された因子がどのように G9a/GLP による転写抑制に寄与しているか、その機構の解明を進めている。

○研究成果の公表

なし

【腱・靭帯形成の分子メカニズムの解明】

○研究代表者 広島大学医系科学研究所 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

basic helix-loop-helix 型の転写因子 Scleraxis (Scx) の欠失マウスでは、腱・靭帯の成熟は損なわれるが (図 1)、腱・靭帯原基そのものは正常に形成されることから、Scx の上流で腱・靭帯の初期形成を司る分子ネットワークが存在することが示唆されている。本研究では、Scx の腱・靭帯特異的発現に関わる enhancer を同定し、その発現を制御する転写因子の実体を明らかにすることを目指した。

Heat shock promoter 68 (hsp68) の minimal promoter と *LacZ* reporter を有する *Asshsp68lacZpA* ベクターにマウス *Scx* のゲノム領域を組み込んで構築した transgene を用いて、胎生 13.5 日の Transgenic (Tg) マウス胚で enhancer 活性を解析した。*Scx* 遺伝子の下流を含む 5.3 kb の領域は、10.8 kb のゲノム領域と同じような腱・靭帯組織特異的な転写制御を担う領域を含んでいた (図 2)。そこで、このゲノム領域を更に細分化して、同様に、*Asshsp68lacZpA* ベクターに挿入し、transgene を構築した。transgene を受精卵にマイクロインジェクションし、胎生 13.5 日の Tg マウス胚において X-gal 染色によって *LacZ* の活性を解析して、*Scx* の腱・靭帯特異的な発現制御領域の絞り込みを行った。これまでに、5.3 kb のゲノム領域内の 1.9 kb の断片に enhancer 活性があることを見出している。一方、*Scx* の promoter 領域を含む 4.3 kb のゲノム断片や promoter よりも上流の 3.6 kb のゲノム断片

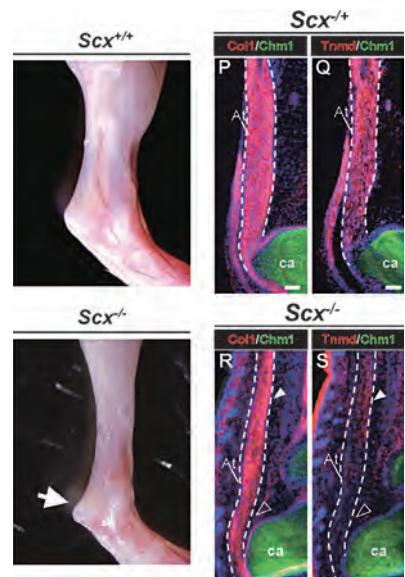


図 1. *Scx* 欠失マウスのアキレス腱における *Tnmd* 発現の消失
(Shukunami et al., *Sci Rep*, 2018)

では、腱・靭帯特異的な enhancer 活性は検出出来なかった。5.3 kb のゲノム領域内の 1.9 kb の断片は、4.3 kb のゲノム断片と 5' 側で一部重複しているが、4.3 kb のゲノム断片には、特異的な enhancer 活性は検出されていないので、4.3 kb のゲノム断片とは重複しない領域に腱・靭帯特異的な発現制御を担う enhancer が存在するのではないかと考えている。

in vitro では、TATA box を含む *Scx* promoter 領域を promoter-less の luciferase ベクターである *pGL4.1[luc2]* に正方向と逆方向に組み込み、*Scx* を発現するラットの四肢腱から分離した腱細胞にトランスフェクションし、Dual luciferase assay によって promoter 活性を確認した。また、minimal promoter を有する *pGL4.23[luc2/minP]* に 10.8 kb のゲノム領域を細分化した 3.6 kb, 5.3 kb, 1.9 kb, 4.3 kb の DNA 断片を挿入し、ラット腱細胞を用いて、Dual luciferase assay を行った。その結果、1.9 kb の領域に、転写活性が見出されている。現在、*Scx* promoter と相互作用するゲノム領域を同定するために、enChIP による解析を進めている。

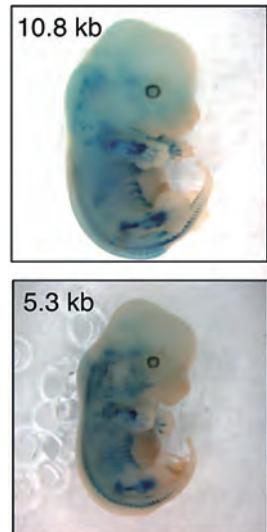


図 2. *ScxLacZTg* 胚
(E13.5)

○研究成果の公表

(招待講演)

筋骨格システムを統合する腱の形成と成熟プロセス：宿南知佐：日本筋学会 第5回学術集会（東京），2019.

(総説)

1. *Scx*を中心とした腱・靭帯・歯周靭帯の機能制御：吉本 由紀、宿南 知佐：The Bone, 33巻、99-104, 2019
2. 腱・靭帯研究のフロンティア「腱・靭帯研究のあゆみ」：宿南 知佐：整形・災害外科, 63巻、83-88, 2020

【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】

○研究代表者 京都大学大学院生命科学研究科 山田 真弓 特定助教

○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

神経幹細胞は自己複製能を持ち、さらに中枢神経系の主要な細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持っている。神経幹細胞の増殖や細胞分化の過程で、bHLH 型転写因子がダイナミックな遺伝子発現パターンを示すことが明らかになりつつあるが、その機能的意義については未だ不明な点が多い。本研究課題では、光遺伝学ツールを用いて、神経幹細胞における bHLH 型転写因子のダイナミックな遺伝子発現パターンを人工的に操作し、その機能的意義の解明を目的とした。

マウス胎児の大脳や脊髄では、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の產生やオリゴデンドロサイト分化過程において、転写因子 Olig1/2 が決定的な役割を担っていることが報告されている。本

研究では、これらの転写因子に着目し、まずは内在性の発現動態をタイムラプス顕微鏡を用いて詳細に観察した。

次に、Olig1/2 の発現動態を光操作するために、光作動性転写因子を安定的に発現する細胞株を樹立した。培養神経幹細胞は脆弱性が高いため、細胞へのダメージが少ない方法を検討する必要があった。そのため、共同研究者が ES 細胞で使用しているトランスポゾン法を導入することで、安定細胞株の作製を容易にすることことができた。青色光により遺伝子発現を効率よく制御できる、Gal4/UAS システム (GAVPO など) や、テトラサイクリン誘導系システム (PA-Tet システム) を神経幹細胞に導入し、光照射により Olig1/2 の遺伝子発現制御を実施した。光照射条件を変更することにより、様々な Olig1/2 の発現動態を人工的に操作し、神経幹細胞の増殖や分化に与える影響を観察中である。さらに、共同研究者からオルガノイド培養方法を教授頂き、培養方法の検討を進めることができた。今後は、*in vivo* に近い条件での機能解析が可能になると期待している。

○研究成果の公表

(発表論文)

1. Kobayashi T, Piao W, Takamura T, Kori H, Miyachi H, Kitano S, Iwamoto Y, **Yamada M**, Imayoshi I, Shioda S, Ballabio A, Kageyama R. (2019) Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells., *Nature communications*. Nov29; 10 (1):5446.
2. **Yamada M**, Nagasaki C. S, Suzuki Y, Hirano Y, and *Imayoshi I., Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells., *in revision*.

(総説)

Yamada M, Nagasaki C. S, Ozawa T, *Imayoshi I. (2020) Light-mediated Control of Gene Expression in Mammalian Cells. *Neuroscience Research*. Mar; 152:66-77.

(学会発表)

山田真弓、長崎真治 *、今吉格：神経幹細胞における bHLH 型転写因子のダイナミックな発現制御機構 . 2019 年度日本神経科学学会、新潟、2019 年 7 月 25 日 -28 日

【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】

○研究代表者 大阪大学大学院歯学研究科口腔外科学第一教室 磯村 恵美子 講師

○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

○研究経過及び研究成果

本研究は、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と多血小板血漿 (PRP) の徐放粒子含有インジェクタブルゲル (IG + P(G)) を用いることで、移植する脂肪由来幹細胞 (ASCs) の歩留まりや治療効果に与える影響を明らかにすることを目的とした。

まず、ゲル化させた IG+P(G) を、10 μ g/ml のコラゲナーゼ溶液によって分解させ、分解試験・薬剤徐放試験を行った。その結果、IG+P(G) は、コラゲナーゼ溶液中において 7 日程度で分解され、同期間中、GF の徐放を認めた。

次に GF (bFGF、PRP) を添加した培地でラットの腹部より採取した脂肪由来幹細胞を培養し、細胞増殖率を WST 試薬を用いた吸光度で、培地上清中のサイトカイン (HGF, VEGF) 濃度を ELISA

(R & D Systems 社) で計測した。結果、bFGF または PRP の単独添加培地は、基礎培地に比べて幹細胞の細胞増殖率と、上清内のサイトカイン濃度の有意な向上を認めた。bFGF と PRP を共に添加した培地は、基礎培地および bFGF または PRP の単独添加培地よりも、幹細胞の細胞増殖率とサイトカイン濃度の有意な向上を認めた。

最後に SD 系ラット 8 週齢雌の咬筋への脂肪由来幹細胞他家移植を行い、各移植媒体を用いた幹細胞移植がラット咬筋組織に及ぼす影響を検討した。注入する溶液は、PBS と IG をベースに、P (G)、徐放粒子単体、徐放粒子なしを組み合わせた 6 群を設定し、右側は幹細胞あり、左側は幹細胞なしとした。結果、切片上の平均移植細胞数は、術後 7 日目において IG+P(G) 群がその他の群と比較して有意に高い数値を示した。また HE 染色では、術後 7 日目でも、筋組織内に徐放粒子が残存しており、IG+P(G) 群、PBS+P(G) 群は、GF 徐放粒子の周囲に細胞の増殖を認めた。また、IG+P(G) 群ではゲル注入部位周囲に一部空胞化した筋線維像を認めたが、術後 14 日目で改善傾向を示し、術後 28 日目では組織修復を認めた。免疫組織化学染色では、術後 2、7、14 日目において、移植した幹細胞が残存している周囲や、GF 徐放粒子の周囲に、血管内皮細胞のマーカーである CD31 の発現を認めた。また、幹細胞なし側においても、GF 徐放粒子残存部では CD31 の発現を認めた。蛍光免疫染色では、術後 28 日目での IG+P(G) 群および PBS+P(G) 群において、移植した ASCs の残存部位に、Myo-D の発現を認めた。

細胞増殖因子徐放粒子含有インジェクタブルゲルは、細胞増殖因子の持続的な供給と、移植細胞の歩留まりを向上させることで、幹細胞の体内生存率を高め、移植治療効率の向上に有効であることが示唆された。しかし移植した幹細胞が、将来的に成熟した筋線維へ分化し、筋力を増強できるのかについては、機能評価を含めたさらなる検討が必要であると考えられる。

○研究成果の公表

(口頭発表)

三ツ井諒、磯村恵美子、松川誠、中川記世子、古郷幹彦、田畠泰彦「細胞増殖因子徐放化粒子とインジェクタブルゲルを用いた脂肪由来幹細胞の筋組織内移植」(第 9 回 DDS 再生医療研究会、2019.12.22 京都)

【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】

○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 細胞生物学応用分野 戸口田 淳也 教授

○研究経過及び研究成果：

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・画像情報とともに収集した。得られた検体よりゲノム DNA を抽出し、全 exome 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* の両アレルの遺伝子変異を CS、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戸口田研究室で 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)。

戸口田研究室でのヒト人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞を段階的に誘導する手法の開発、脊椎の発生を試験管内 (*in vitro*) で再現するモデルの確立 (Matsuda *et al.* Nature 2020) のために、SCDO の大規模シーケンス解析を行った。

○研究成果の公表

(発表論文)

1. 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* 56 (9):622-628, 2019.
2. Matsuda M, Yamanaka Y, Uemura M, Osawa M, Saito MK, Nagahashi A, Nishio M, Guo L, Ikegawa S, Sakurai S, Kihara S, Maurissen TL, Nakamura M, Matsumoto T, Yoshitomi H, Ikeya M, Kawakami N, Yamamoto T, Woltjen K, Ebisuya M, Toguchida J, Alev C. Recapitulating the human segmentation clock with pluripotent stem cells. *Nature* 580 (7801):124-129, 2020.

(学会発表)

【国内】

1. ヒトゲノム解析の基礎知識：パーソナルゲノム時代に取り残されないために，池川志郎，北里大学薬学研究科大学院 特別講義，2019.05.09.
2. 骨系統疾患のゲノム解析，池川志郎，New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders, 2019.06.29
3. ゲノム医療について，池川志郎，第 46 回 難病患者・障害者と家族の全道集会 2019.08.03.
4. 病気と遺伝：これから医学・医療を理解するための基礎知識。愛媛大特別講義，池川志郎，2019.10.03.
5. 疾患の診断と治療に向けた大規模多次元データによるゲノム解析—整形外科疾患を例に，池川志郎，理研イブニングセミナー，2020.01.15.

【海外】

1. Genetic study of skeletal dysplasia, 口頭，池川志郎，APSS-APPOS 2019, Apr 4, 2019.
2. Genomic Study of Bone and Joint Diseases-Study of Genetic Disease in the Genome Sequencing Era, 口頭，池川志郎，台北医科大学薬学部特別講義 (Master program for Clinical Pharmacogenetics and Pharmacoproteomics), Jul 4, 2019.
3. Bi-allelic Loss of Function of Segmentation Clock Genes, *TBX6* and *LFNG* Causes a Spectrum of Malformation of Spine, including Congenital Scoliosis and Spondylo-Costal Dysostosis, 口頭，池川志郎，14th ISDS meeting, Oslo, Norway, Sep 14, 2019.
4. Genomic study of skeletal dysplasia in the personal genome sequence era, 口頭，池川志郎，4th National

Pediatric Genetics Congress, Sep 25, 2019.

5. Genomic study of Diseases in the Genome Sequencing Era, 口頭, 池川志郎, 中国医学科学院基礎研究所セミナー, Dec. 2, 2019.
6. Genomic study of Diseases in the Genome Sequencing Era, 口頭, 池川志郎, 北京協和医学院病院骨科セミナー, Dec. 3, 2019.

【再生組織工学のための多階層細胞メカノバイオロジー研究】

○研究代表者 カリフォルニア大学バークレー校 Mohammad R. K. Mofrad 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授

○研究経過及び研究成果

細胞が力学環境に適応するうえで、細胞外から細胞内への接着分子複合体を介した力の伝達は重要である。力が加わると新たに形成される複合体の形成初期において、複合体とアクチンとの接続強化は、細胞内に外力を伝達するための鍵となる。この形成初期において、細胞外から細胞内への力伝達を担うのは複合体の剛性であるため、複合体の構造形成に伴う剛性の変化は複合体の成熟に寄与すると考えられる。本研究では、接着タンパク質タリンは、複合体の形成初期においてその剛性を変化させる重要な因子であるとの仮説に基づき、接着分子複合体のナノスケールレベルにおける実験を行った。原子間力顯微鏡（AFM）を用いて細胞上で複合体の剛性を測定した結果、その剛性は時間とともに増加し、さらに、その増加にはタリンが重要な役割を果たしていることが示された。これらの結果は、タリンが、力に応答して複合体とアクチン構造体との接続を強化したために引き起こされたと考えられる。このメカノバイオロジー研究は、細胞足場材料・構造を用いた再生組織工学の分野において、幹細胞が周囲の力場や剛性を感じし、その情報を細胞内情報へと変換することで自らの分化状態や細胞挙動を制御する機構の解明において、基礎的な知見を与えるものである。

○研究成果の公表

(発表論文)

Nobuhiko Nakao, Koichiro Maki, Mohammad R. K. Mofrad, Taiji Adachi, 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, (2019). DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.091

(学会発表)

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, No. 19-302, 1A14, (2019.12.20-21), 金沢

【PRRX1⁺ 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解】

○研究代表者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（医） 宝田 剛志 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

【ソニック・ヘッジホッグシグナルの新規生理学的機能の解明】

○研究代表者 奈良先端科学技術大学院大学 笹井 紀明 准教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授

○研究経過及び研究成果：

ソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; Shh) は胚発生における形態形成や細胞分化のほか、生後の脳神経系における幹細胞の維持や増殖など、全ライフコースにわたって組織の機能維持のために必須の役割を担う分泌因子（シグナル因子）である。各組織や発生（または成長）ステージにおいて異なるターゲット遺伝子の発現が誘導され、それによって機能の多様性が生み出されると考えられるが、その個々の遺伝子の機能解析は進んでいない。

申請者らは以前に、培養細胞や神経前駆細胞において Shh のターゲット遺伝子の探索を行い、CDK18 や WDR17 などの機能不明の遺伝子を多数単離し、その機能解析を進めている。本共同研究では、ソニック・ヘッジホッグによって発現誘導される遺伝子の 2 つの遺伝子変異マウスを作成し、その個体レベルにおける機能を解析した。

CDK18 と WDR17 はそれぞれ胚発生において神経管の底板領域に強く発現し、Shh によって発現が誘導される。遺伝子に CRISPR/Cas9 法によりゲノムに遺伝子変異を生じさせ、その表現型を解析した。その結果、いずれも胚性致死ではなかったが、生後に変化が見られる結果となった。CDK18 の解析に加え、今年度は WDR17 の解析を行った。

(1) CDK18 遺伝子変異マウスの解析

CDK18 は Shh シグナルによって発現が誘導され、Shh 依存的な細胞増殖に関与することがこれまでの細胞レベルでの解析から明らかになってきた。また、変異マウスは胚性致死ではなかったが、変異胚から抽出した細胞においては Shh シグナルが誘導する細胞増殖の増加が見られず、一部のがん遺伝子産物（タンパク質）のリン酸化が抑制される結果となった。

(2) WDR17 遺伝子変異マウスの解析

WDR17 遺伝子変異マウスも胚性致死ではなかったが、加齢とともに体重が増加する傾向にあることが明らかになった。実際に内臓を調べたところ、皮下脂肪や肝臓のサイズが有意に増加していた。そこで、臍臓などの機能を詳細に調べたところ、一部のホルモンの分泌量が減少していることがわかり、WDR17 がこのホルモンの発現を調節する機能を持つことが示唆された。

細胞生物学的解析から、WDR17 は細胞の核内に存在し、エピゲノム因子群と複合体を形成して遺伝子発現を調節することが示唆される。そこで、このメカニズムを詳細に追求している。

○研究成果の公表

(論文)

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 postnatal metabolic regulation". 準備中
(学会発表)

西（堀）晶子，井上亜美，渡邊仁美，近藤玄，廣田圭司，笹井紀明 「CDK18 は Gli3 のリン酸化を介

して Sonic Hedgehog 経路を調節する」第 42 回日本分子生物学会年会（福岡：2019 年 12 月）

【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】

○研究代表者 熊本大学生命資源研究・支援センター 竹尾 透 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 附属再生実験動物施設 渡邊 仁美 助教

○研究経過及び研究成果：

体外受精技術は、医療、畜産、産業動物の作製に広く利用されている。しかしながら、体外受精の受精率は、動物種、精子の性状、培地の条件に強く依存し、予測が困難であり、より効率的な体外受精技術の開発が求められている。申請者は、受精率向上の糸口として、精子由来受精阻害因子が受精率の低下に関与することを見出している。また、受精率向上に有用な技術として、雌性生殖道内における精子の選別を模倣した技術の開発にも取り組んでいる。そこで本研究では、精子由来受精阻害因子の解明およびセルソーターによる受精能獲得精子選別法の開発を試みた。精子由来受精率阻害因子については、受精阻害試験により、受精能低下が起こる条件を決定した。次に、セルソーターによる受精能獲得精子選別法の開発では、運動能および受精能を維持したままマウス精子の選別する技術を確立し、受精能獲得精子の選別、体外受精における受精率を評価することに成功した。今後は、精子由来受精率阻害因子に関する詳細な検討を進める予定である。また、セルソーターを用いた精子選別技術を応用し、体外受精技術の改良や精子の機能解析を進めていきたい。

最後に、本研究をご支援いただ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. 「マウス生殖工学におけるイノベーションの創出」竹尾 透、第 43 回西日本薬剤学研究会、大分、2019 年 8 月 23 日
2. 「Accelerating animal research by mouse reproductive technology」 Toru Takeo, Naomi Nakagata, Mini Symposium at Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, 2019 年 7 月 5 日
3. 「Mouse Reproductive Technology」 Toru Takeo, Naomi Nakagata, TT2019 Workshop, Kobe, 2019 年 4 月 11 日

【Hypothesis driven loss-of-function screen in mice for cooperating genes involved with the canonical WNT signaling molecular class of hepatocellular carcinoma】

○研究代表者 香港理工大学 Vincent Keng 准教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授

○研究経過及び研究成果：

肝細胞ガン発症に関与する因子を探索するため、in vivo CRISPR スクリーニングを行なった。使用したガイド RNA ライブライマーは、マウス肝細胞で発現する 3600 遺伝子に対するもので、変異 β カテニンとともに Sleeping Beauty トランスポゾンへ組み込んだ。このトランスポゾンライブルー

を Sleeping Beauty 転移酵素および Cas9 酵素を発現するマウスへ hydrodynamic injection 法により導入し、肝細胞への変異導入を行なった。変異 β カテニン単独と比べ、ガイド RNA も持つトランスポゾンを導入したグループから、有意に高い発がんが見られた。肝細胞がん腫瘍をそれぞれを切り出し、どのガイド RNA を保持するか、次世代シーケンサー解析を行なった。結果、Nf2 のガイド RNA を top hit として見出し、スクリーニングが機能していることが示された。またこの他にもこれまで知られていない遺伝子を見出しており、今後詳細な機能解析を行う予定である。

【マウス ES 細胞の不均一性の機能解析】

○研究代表者 奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授

附属再生実験動物施設 渡邊 仁美 助教

○研究経過及び研究成果：

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により、マウス ES 細胞に未知の不均一性が存在することを特定した。本共同研究では、この ES 細胞の不均一性が、ES 細胞のキメラ個体形成能の違いを規定することを明らかにし、さらに、不均一性を規定する転写因子を特定した。また、我々は、エピプラスト幹細胞を ES 細胞様の状態へ遷移させる低分子化合物を同定していたが、この遷移後の状態が ES 細胞と同等であることを、キメラ個体形成能の獲得により証明した。さらに、我々が新たに特定した ES 細胞の初期分化を制御する遺伝子について、個体発生過程での解析を行うために、GFP 遺伝子をノックインしたマウス個体を作製した。

○研究成果の公表

(学会発表)

Kyoji Horie, Hitomi Watanabe, Yosuke Nishimura, Hikaru Watanabe, Masahide Seki, Akio Seita, Kagayaki Kato, Yuichi Wakayama, Jun Sese, Yutaka Suzuki, Takuji Yamada, Gen Kondoh, Junko Yoshida. Identifying the heterogeneity of ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells and elucidating its regulatory mechanism. 第 42 回日本分子生物学会年会 2019.12.4 福岡

【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】

○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微小環境 (ニッチ) の中心的な構成細胞であることが示された。さらに 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、CAR 細胞は成体で自己複製し骨芽細胞および脂肪細胞を供給する間葉系幹細胞であることが明らかになった (Omatsu Y. et al., *Nature*, 2014, Seike M. et al., *Gene Dev.*, 2018)。一方、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 (Agarwal, P. et al., *Cell Stem Cell* 2019) 等を用いた予備的な解析により、CAR 細胞

で CXCL12, SCF, Foxc1 などの造血幹細胞・造血ニッチ機能に必須の遺伝子の発現低下が認められただけでなく、定常状態の CAR 細胞ではほとんど発現していない機能不明の遺伝子の発現上昇が認められた。このような遺伝子は加齢や炎症などのストレスによって誘導される CAR 細胞の変容（機能低下）に関わる重要な遺伝子である可能性が考えられた。そこで本研究では、[1] ニッチの変容を引き起こすシグナル経路と [2] ニッチの変容を制御する分子機構の解明を目的とした。

[1] CAR 細胞に発現しているサイトカイン受容体に着目し Tnfrsf1a, Il1r1, Osmr, Pdgfra, Pdgfrb, gp130 などの flox マウスを作製あるいは入手し、CAR 細胞特異的 Cre 発現マウスを交配することにより、CAR 細胞特異的欠損マウスを作製した。現在、得られたマウスを用いて主に造血器腫瘍モデルを実施し、骨髓造血と CAR 細胞の経時的变化の解析を進行している。

[2] CAR 細胞の変容に伴って著明に発現上昇する機能不明の遺伝子を複数同定した。中でも転写因子としての機能が予想された遺伝子について着目し、in vitro の機能解析を行うとともに in vivo における機能解析のために flox マウスの作製に着手した。先行して得られた 1 系統については CAR 細胞細胞特異的 Cre 発現マウスを交配することにより、CAR 細胞特異的欠損マウスの作製を進行している。

○研究成果の公表

（発表論文）

1. Fukushima, K., Satoh, T., Sugihara, F., Sato, Y., Okamoto, T., Mitsui, Y., Yoshio, S., Li, S., Nojima, S., Motooka, D., Nakamura, S., Kida, H., Standley, DM., Morii, E., Kanto, T., Yanagita, M., Matsuura, Y., Nagasawa, T., Kumanogoh, A., Akira, S. Dysregulated Expression of the Nuclear Exosome Targeting Complex Component Rbm7 in Nonhematopoietic Cells Licenses the Development of Fibrosis. *Immunity.* 52 (3):542-556, 2020
2. Matsushita, Y., Nagata, M., Kozloff, KM., Welch, JD., Mizuhashi, K., Tokavanich, N., Hallett, SA., Link, DC., Nagasawa, T., Ono, W., Ono, N. A Wnt-mediated transformation of the bone marrow stromal cell identity orchestrates skeletal regeneration. *Nat. Commun.* 11 (1):332, 2020
3. Mukohira, H., Hara, T., Abe, S., Tani-Ichi, S., Sehara-Fujisawa, A., Nagasawa, T., Tobe, K., Ikuta, K. Mesenchymal stromal cells in bone marrow express adiponectin and are efficiently targeted by an adiponectin promoter-driven Cre transgene. *Int. Immunol.* 31 (11):729-742, 2019

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点
2019 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2019 年 4 月～2020 年 3 月）

①靈長類 P3 感染実験

靈長類 P3 感染実験として計 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
- 研究成果：

H30 年度までの研究を発展させ、SIV Gag/Vif 断片連結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の SIV 特異的免疫反応解析を継続するとともに、SIV 経直腸接種実験を推進し、感染防御効果を示す有望な結果を得た。Immuno-correlates 解明に向け、SIV 特異的 T 細胞反応のデータを収集・蓄積している。

【HIV-1 感染症の根治療法創出のための基礎・応用研究】

- 研究代表者：京都大学靈長類研究所 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
- 研究成果：

HIV 持続感染カニクイザルへの ART 投与により血漿ウイルス RNA 値が検出限界以下にまで低下し、投与中断によりウイルス血症へと回帰することが実証された。すなわち HIV は ART により感染増殖が制御可能であること、ART 中断によりリバウンドが生じることなどから、当該サルモデルは HIV 感染者と同等な感染動態を示していることが明らかとなった。以上より本モデルは、shock and kill 療法の前臨床試験における有効性評価に非常に有用であると考えられた。

【アカゲザル iPSC 由来遺伝子改変細胞の生体内評価】

- 研究代表者：京都大学 iPS 細胞研究所 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
- 研究成果：

アカゲザル由来 iPS 細胞に対する CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集の系を確立した。次に、アカゲザル由来 iPS 細胞に SHIV に対する感染防御能を付与する目的に、SHIV の感染受容体である CCR5 をノックアウトした iPS 細胞株を作成した (Δ CCR5 iPS 細胞)。 Δ CCR5 iPS 細胞から分化誘導したマクロファージは SHIV に対する感染抵抗性を有していることを *in vitro* で確認した。

②マウス P3 感染実験

マウス P3 感染実験として計 2 件の研究を行った。

【ヒト化マウスマodelを用いたウイルス感染細胞のシングルセル解析】

○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、特定研究員 三沢 尚子、
大学院生 麻生 啓文

○研究成果：

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（ウイルス產生細胞）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

○研究成果：

Duo-Fluo HIV を Jurkat T 細胞に感染させ潜伏感染細胞、ウイルス產生感染細胞、非感染細胞に分画し遺伝子発現解析を施行した。潜伏感染細胞特異的に発現が低下する遺伝子を 30 種同定し解析中である。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 クローン得ている。

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 18 件の研究を行った。

【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】

○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

○研究成果：

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からこれまでに見出している bardoxolone methy (BARD) の抗 HBV 機構を解析した。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 増殖を抑制することがわかった。また BARD の働きの一つは HBV pgRNA 量を転写後に低下させることであり、その効果は転写そのものの抑制ではなく、pgRNA の半減期を低下させることであることがわかった。

【生後脳神経新生による記憶痕跡回路の制御機構解明】

○研究代表者：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授 奥野 浩行

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 影山 龍一郎

○研究成果：

海馬歯状回における記憶痕跡細胞を可視化するため遺伝子発現レポータートランスジェニックマウスを用いて記憶形成および想起後のレポーター陽性細胞を組織学的に計測した。また、新生神経細胞を操作するための基盤技術に関して、影山教授および京都大学・生命科学研究科の今吉格教授とともに開発を進めた。さらに、自由活動中のマウス歯状回の神経活動を可視化するイメージング系を確立した。

【抗体断片と複合体を形成した 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
- 研究成果：

細菌型 S2P ホモログの可溶性断片を免疫して取得したモノクローナル抗体をパパイン処理によって Fab 化し、まず、抗原断片との共結晶化を行い、複合体の結晶構造を決定することで、それぞれの抗体が抗原のどの領域をエピトープとして認識するかを詳細にしらべた。そして、全長タンパク質と Fab 断片の複合体試料を作製して、ネガティブ染色法による単粒子解析を行った。

【CRISPR/Cas9 による長鎖 DNA ノックインマウス作製法の確立】

- 研究代表者：大阪大学大学院生命機能研究科 教授 立花 誠
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 朝長 啓造
- 研究成果：

ゲノム編集技術の進歩により、従来に比較して、遺伝子改変マウスの作製が容易になった。本申請研究では、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を応用し、性決定遺伝子 Sry の各種変異体（Flag タグノックインマウス、遺伝子欠損マウス、1 アミノ酸変異マウス、トランスジェニックマウス）を作製し、その機能解析を行った。結果として、これまでに知られていない新規性決定領域を発見するに至った。

【mTOR シグナルによる骨格の恒常性維持機構の解明】

- 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
- 研究成果：

本研究では、mTOR シグナル異常と難治性骨系統疾患発症との関連性を明らかにすることを目的とした。細胞特異的な遺伝子改変マウスの作製と解析により、軟骨細胞の mTOR シグナルを活性化すると、脊椎側弯と胸郭異常を含む骨格形成異常が生じることを見い出した。さらに、mTOR 活性化軟骨細胞において、骨格恒常性維持に関与する特定の転写因子群が著明に変動していることを明らかにした。

【概日リズム攪乱による生体防御機能の障害】

- 研究代表者：京都府立医科大学医学研究科 教授 八木田 和弘

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 生田 宏一、研究員 植葉 旭恒

○研究成果：

一年以上の長期概日リズム搅乱マウスの末梢血、脾臓、リンパ節からリンパ球を単離し、まずフローサイトメトリーにて様々な細胞表面マーカーの発現を解析したところ、PD-1 陽性 CD44 強陽性の CD4 T 細胞（老化関連 T 細胞）と CD95 陽性 GL7 陽性の胚中心 B 細胞（老化関連 B 細胞）の割合がコントロールマウスと比較して増加していた。さらに、炎症誘導性の IL-17 を発現する CD4 T 細胞（Th17 細胞）の頻度が上昇していた。以上の結果から、概日リズムの搅乱により慢性炎症と免疫老化が加速することが明らかになった。

【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】

○研究代表者：大阪大学蛋白質研究所 特任研究員 杉田 征彦

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 野田 岳志

○研究成果：

クライオ電子顕微鏡法によりマールブルクウィルスの NP-RNA 複合体の構造解析を行い、その高分解能構造を決定した。明らかになった複合体構造から、NP-RNA 相互作用部位および NP-NP 相互作用部位を見出した。これらの相互作用領域はマールブルグウィルスの粒子形成に重要であるほか、その形成が阻害されるとゲノム RNA の転写・複製を行うこともできなくなるため、重要な創薬ターゲットとなると考えられる。

【Blastocyst への細胞移植効率を向上させる新規手法の開発】

○研究代表者：Korea Brain Research Institute Lab Head 小曾戸 陽一

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：助教 小林 妙子、技術専門員 宮地 均

○研究成果：

今年度は、マウスの Blastocyst に ES 細胞を注入する際に、EGTA を発生に支障がない濃度で添加することで、ドナー細胞が ICM に取り込まれる条件を検討するための手法を確立した。具体的な実験として、1) 使用する化合物（EGTA）濃度を検討し、20mM において正常な胚発生の継続を確認した、2) 移植されたマウス ES 細胞について、ICM への生着確認のため蛍光物質を用いて標識・観察する手法の確立を行った。

【ボルナウイルスベクターからの遺伝子発現制御法の開発】

○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ウイルス学 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

○研究成果：

REVec-L2b9 にレポーター遺伝子を導入した REVec-GLuc-L2b9 は、テオフィリン濃度依存的にレポーター遺伝子発現を制御し、またその発現制御は可逆的であった。REVec-L2b9 に small GTPase の一種である Rac1 を導入した REVec-Rac1-L2b9 を用いて、テオフィリン濃度依存的に細胞膜上のひだ状構造の形成を制御することに成功した。

【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

○研究成果：

研究代表者が開発した SLOT 法に改良を加え最適化した「SLOT 法 2.0」により、これまで以上に効率的に高機能抗体の取得が可能となる。本研究では SLOT 法 2.0 を用いて、病原性ウイルスに対する高機能抗体を創出するため、その各種条件について検討を行った。ウイルス抗原の種類および投与量と投与タイミング、免疫細胞に対する中和抗体の投与量やタイミングの条件を最適化することで、SLOT 法 2.0 による抗体取得法を確立した。

【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】

○研究代表者：京都産業大学総合生命科学部生命科学研究科 准教授 川根 公樹

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 藤田 尚志

○研究成果：

哺乳類培養細胞を用いた解析により、ショウジョウバエを用いて得られていた知見である、細胞脱落における上皮バリアを維持するための細胞間接着の動態及び、細胞脱落の実行の推進力である可能性のある膜動態が同様に観察され、これらは種を超えて保存された細胞脱落における普遍的機構であることが示された。またこれに関与する遺伝子を明らかにした。

【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】

○研究代表者：京都大学大学院生命科学研究科 特定助教 山田 真弓

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 影山 龍一郎

○研究成果：

新規に開発した光操作技術を搭載したレンチウイルスを用いて、培養神経幹細胞に光操作システムを導入した。転写因子 Olig1/2 の内在性のダイナミックな発現をタイムラプス顕微鏡により観察し、光操作技術によって人工的に再現するために、光照射条件の検討を行った。Olig1/2 の様々な発現動態を誘導した際に、神経幹細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるのかを観察した。

【AKT 活性化による神経変性疾患の理解】

○研究代表者：長浜バイオ大学サイエンス学部 助教 阪上 起世

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 影山 龍一郎、特定助教 下條 博美、技術専門員 宮地 均

○研究成果：

京都大学ウイルス・再生医科学研究所の影山龍一郎教授との共同研究により、ユビキタスな発現が保証されている Gt (Rosa) 26Sor 遺伝子座に、human AKT1 あるいは活性型 AKT を挿入した 2 系統のノックインマウスを作製する。現在、Gt (Rosa) 26Sor 遺伝子座に CAG プロモーター下に loxP-,

frt-flanked STOP カセットと human AKT1 あるいは活性型 AKT を挿入したターゲティングベクター構築を試みている。

[Determining structural conditions of reaction networks for diversity of dynamical behaviors of cells (細胞の動的挙動の多様性を生み出すための反応ネットワークの構造的条件の決定)]

○研究代表者：Department of Mathematics, National Tsing Hua University, Taiwan Professor Je-Chiang Tsai

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 望月 敦史

○研究成果：

We improved and generalizde our theory to apply to broad range of biological behaviors. We accomplished our project by close discussions with Dr. Mochizuki by a visiting study at inFront, Kyoto Univ. We analyzed real biological systems, and show that our method is practical to understand mechanism for diversity of biological behaviors of reaction systems. We are writing a theoretical paper, where we show the achievements of generalization of our structural bifurcation analysis.

(本プロジェクトにおいて、我々が過去に開発した「構造分岐解析」理論を改良し、より広い力学挙動のクラスや、より様々な生物現象に適用できるようにした。申請者は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所を訪問し、望月教授と議論することでプロジェクトを進めた。中心代謝系など実際の生物のシステムを解析し、反応システムの挙動の多様性を理解する上で、我々の手法が実用的であることを示した。共同研究の成果は、一般化構造分岐解析として、理論系の論文にまとめているところである。)

[Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using Sendai virus based CRISPR/CAS9 delivery system (CRISPR/CAS9 発現センダイウイルスベクターに基づく選択的抗 HIV 遺伝子治療法の開発)]

○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

○研究成果：

We developed Sendai virus (SeV) vectors to transiently express CRISPR/CAS9 for co-editing CCR5 and HPRT and testing the efficiency of HPRT/CCR5 editing in human CD34+ HSPC. We examined (1) the efficiency of SeV vector transduction in CD34+ HSPC, (2) determined the frequency of HPRT and CCR5 editing in CD34+ HSPC, (3) examined positive selection of HPRT-edited CD34+ HSPC with 6TG, and (4) determined the frequency of off-target sites in CD34+ HSPC.

(*ccr5* と *hppt* 遺伝子編集用 CRISPR/CAS9 一過性発現センダイウイルスベクターを開発し、ヒト CD34 陽性血液幹細胞において、これら *ccr5* と *hppt* に対する遺伝子編集効果を検討した。本研究に関して、以下の検討をおこなった。(1) センダイウイルスベクターの CD34 陽性血液幹細胞への導入効果 (2) この細胞における *hppt* と *ccr5* 遺伝子編集頻度 (3) *hppt* 変異による 6TG 添加による選

択的耐性率（4）CD34 陽性血液幹細胞におけるオフターゲット頻度である。)

[A CRISPR-based reporter of Borna disease virus RNA-to-RNA, virus-to-host gene flow (内在性ボルナウイルス様配列に由来する piRNA の免疫学的影響に関する研究)]

- 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
- 研究成果：

We determined that no new previously unannotated EBLNs are present in the mouse genome, obtained knock-out mice, and generated virus stocks for ongoing infection experiments to answer the remaining two questions.

(我々は、マウスゲノムには新たな未同定の EBLN が存在しないと判断した。そこで、ノックアウトマウスを作製し、感染実験のための BoDV 株のウイルスストックの作製を断続的に行った。)

[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]

- 研究代表者：長崎大学熱帯医学研究所 助教 浦田 秀造
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 杉田 昌彦、助教 水谷 龍明
- 研究成果：

リンパ球性脈絡膜炎ウイルス (LCMV) の Z を複数個挟む形で SECFP と Venus を付加した融合タンパク質を作製することで、Z 多量体化をモニターし、かつハイスクリーピングに適した FRET プローブを開発した。本 FRET プローブを用いて、PathogenBox400 化合物をスクリーニングした結果、ヒット化合物を得た。得られたヒット化合物の内 1 つは、抗 LCMV 効果を示した。

[皮膚の恒常性維持における表皮幹細胞のダイナミクス解析]

- 研究代表者：熊本大学国際先端医学研究機構 特任准教授 佐田 亜依子
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 豊島 文子、特定助教 一條 遼
- 研究成果：

妊娠マウスの腹部皮膚では、Tbx3 陽性の基底細胞は分裂回数の多い細胞集団に属し、fast cycling 表皮幹細胞から出現することが分かった。また、新陳代謝が早い肢裏の皮膚では、fast cycling 表皮幹細胞と Tbx3 陽性細胞が基底層に恒常的に存在していた。Tbx3 陽性細胞をラベルトレースした結果、この細胞集団は、妊娠期腹部に一過的に出現して出産後には分化して表皮から排出されることが分かった。一方、肢裏皮膚では自己複製能と多分化能を備えた幹細胞性を長期間維持することが分かった。このことから、Tbx3 陽性細胞は、生理的変化や体表領域によって幹細胞性と細胞運命が変化する特性を持つことが分かった。現在、この特性変化を生み出す要因の解明を試みている。

2020 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
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遺伝性側弯症の分子病態の解明
理化学研究所生命機能科学研究センター 平谷 伊智朗 チームリーダー	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	DNA複製タイミングおよび核内コンパートメント制御因子の網羅的スクリーニング
MRC Centre for Regenerative Medicine University of Edinburgh Keisuke Kaji Professor	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	Fitness gene profiling in chemically reprogrammed hepatic precursor cells
近畿大学医学部 高藤 義正 助教	生体材料学分野 田畠 泰彦 教授	骨格筋由来細胞外小胞の骨組織再生における役割の解明
大阪大学大学院基礎工学研究科 出口 真次 教授	バイオメカニクス分野 オケヨ ケネディ オモンディ 講師	幹細胞の分化状態と常在収縮力の相関解析
国立精神・神経医療研究センター 川内 大輔 室長	発生システム制御分野 永樂 元次 教授	ヒト ES 細胞由来の人工脳細胞を用いた脳腫瘍モデルの開発
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	骨粗鬆症治療薬による骨代謝調節機構の細胞動態に基づく数理解析
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	Studies of Cellular Mechanotransduction Pathways from Extracellular Matrix to the Nucleus
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・前駆細胞ニッチの変質と再生における分子機構と細胞動態の解明
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	組織形成における概日時計成立の生物学的意義
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
東京大学医科学研究所附属病院 小沼 貴晶 助教	がん・幹細胞シグナル分野 伊藤 貴浩 教授	新規膜タンパクによる造血幹細胞制御機構の解明
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	分子デリバリーシステムの組織浸透性に対する幹細胞凝集体の細胞外環境要因の解明
Wellcome Sanger Institute Leopold Parts Group Leader	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	Optimization of experimental parameters of single-cell CRISPR screening in human pluripotent stem cells
秋田大学医学部附属病院 嘉島 相輝 助教	再生免疫学分野 河本 宏 教授	iPS 細胞技術を用いた固形がんに対する他家移植用 CAR-T 細胞療法の開発
東海大学健康学部 宮沢 正樹 講師	がん・幹細胞シグナル分野 伊藤 貴浩 教授	造血幹細胞および白血病幹細胞における新規鉄代謝制御因子の機能解析
大阪大学大学院生命機能研究科 月田 早智子 特任教授	附属再生実験動物施設 渡邊 仁美 助教	遺伝子改変マウスを用いた多纖毛上皮細胞のアピカル秩序構築・再生原理の探索
神戸大学バイオシグナル総合研究センター 森垣 憲一 准教授	ナノバイオプロセス分野 笠井 倫志 助教	パターン化人工膜と細胞の接着により形成するナノ空間を用いた細胞間隙モデルの創成

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	組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授	PRRX1 ⁺ 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解
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	炎症環境に対する骨髓造血適応を制御する転写後制御機構の解明

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点

① 靈長類 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
熊本大学大学院生命科学研究部 安永 純一朗 准教授	靈長類モデル分野 三浦 智行 准教授	免疫チェックポイント阻害薬による STLV-1 感染動態変動の解析
国立感染症研究所エイズ研究センター 侯野 哲朗 センター長	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 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 iPS 細胞由来遺伝子改変 T 細胞の生体内評価
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	靈長類モデルを用いた HIV 根治療法の評価研究

② マウス P3 感染実験

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 小杉 優介 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マルチオミクス解析
京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学 高折 晃史 教授	システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授	新規 HIV-1 治療法の確立

③ 遺伝子・細胞レベルのウイルス・生命科学研究

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	Bardoxolone methyl の B 型肝炎ウイルス増殖抑制分子メカニズムの解明
同志社女子大学 薬学部 医療薬学科 高橋 知里 特任助手	組織恒常性システム分野 小田 裕香子 助教	新規生理活性ペプチドによる上皮バリア形成誘導機構の解明
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 石井 優 教授	免疫制御分野 生田 宏一 教授 崔 広為 助教 阿部 真也 研究員	感染モデルにおける骨髓 NK 細胞の動態の解明
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 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
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
大阪大学大学院生命機能研究科 下條 博美 助教	増殖制御システム分野 影山 龍一郎 教授	転写因子 Neurog2 の発現動態の多様性によって制御される細胞運命決定機構の解明
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	ジリス内在性ボルナウイルス様配列の機能解析
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	電子顕微鏡イメージングによる細菌型 S2P のドメイン配置の推定
京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 伊吹 謙太郎 准教授	靈長類モデル分野 三浦 智行 准教授	サル免疫細胞を持つマウスにおける SIV 感染病態の解析
慶應義塾大学先端生命科学研究所 井上 浄 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 大塚 俊之 准教授	レンチウイルスを用いた、神経幹細胞の分化制御メカニズムの解明
藤田医科大学総合医科学研究所 前田 明 教授	RNA システム分野 大野 隆人 教授 谷口 一郎 助教	環状 RNA の細胞内局在機構の解明と核内低分子 RNA の 3'-プロセシング因子の同定
国立感染症研究所ウイルス I 部 高松 由基 主任研究官	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	エボラウイルスのヌクレオカプシド輸送機序の解明
京都大学農学研究科 松浦 健二 教授	ウイルス共進化分野 宮沢 孝幸 准教授	シロアリのカースト分化運命決定に関わるエピジェネティック制御機構の解明
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 准教授	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
群馬大学大学院医学系研究科生体防御学 神谷 亘 教授	RNA ウィルス分野 朝長 啓造 教授	新興コロナウイルスに対するワクチンプラットホームの開発とその応用
山形県立米沢栄養大学健康栄養学部 成田 新一郎 教授	生体膜システム分野 秋山 芳展 教授 大門 康志 研究員	大腸菌 BepA の機能制御機構の解析

熊本大学ヒトレトロウイルス学共同
研究センター
松下 修三 教授

システムウイルス学分野
小柳 義夫 教授
志村 和也 助教

COVID-19 に対する治療法の開発

構成員名簿

(2021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◆

川口寧（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>

仁科博史（東京医科歯科大学難治疾患研究所所長）
岡田雅人（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 灵長類医科学研究センター長）
川口寧（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■

<ウイルス制御分野>

教授：橋口隆生

<RNAウイルス分野>

教授：朝長啓造 助教：牧野晶子 特定准教授：堀江真行

特定職員：山下はるか 研究員（非常勤）：小森園亮

大学院生：Bea Garcia, 酒井まどか, 向井八尋, 神田雄大, 川崎純菜, Lin, Hsien Hem, 鬼丸 楓, 渡部雄斗, 岩田美智子, 鍋加有佑

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 派遣職員（事務補佐員）：齋藤千晴

臨床検査技師：大西知帆 大学院生：藤田陽子, 梶川純一, 視部和也, 胡 上帆, 張 子涵, 野田隆斗

学部生：廣瀬奈々美, 角田優伍

<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：二階堂篤, Song HoJong, 香月沙葉

<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：麻 実乃莉, 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 研究員：阿部真也

大学院生：旭 拓真, 江島亜希, 高見大地, 角間萌美, 大平慶藏, 山田浩平, 岡本麻弥

共同研究者：谷一靖江, 高原和彥, 棚葉旭恒, 南部由希子, 前田道之, 淀井淳司

<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, 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：床田千穂子 事務補佐員：高橋香織, 岡田千明 派遣職員：桑原寿江, 雲財 知

大学院生：村田勇樹, 上本祐介, 鈴木久美子, 古根川靖, 田畠琢也, 中上和城, 江見翼, 阿部哲士, 竹花 祥,

Gao Linn, Yang Wenxuan, Pnitporn Laowpanitchakorn 研究生：鈴木貴久

学部生：松下 渉, 鷺阪太一, 堀下駿太

研究員（民間等共同研究員）：中村耕一郎, 松野久美子, 下濃健治, 山本勝徳, 鈴木陽介, 遠山絹華, 岩澤大二郎

研究員（受託研究員）：上村 聰, 木村幸史, 宮寄 奏, 古田瑛理, 古川秀樹, 大室純子, 佐伯健造, 小林直紀, 中尾進悟,

研究員（内地研究員）：西東洋一 共同研究者：藤本洋平, 安部友大, 吉崎香琳, 新居輝樹

外国人共同研究者：Chen Yu Ping

<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：永野誠治, 小林由佳, 上堀淳二

特定研究員：長畠洋佑, 加藤雄真, 宮崎和子, Zhen Hangyu, 小西理予, DE ALMEIDA Glicia Maria

非常勤研究員：渡邊 武，岸本加恵 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，野口友里亜 派遣職員（事務補佐員）：宮武明子

大学院生：西村有史，水野 林，高 宇嫗 特別研究学生：吉谷竜男 共同研究者：嘉島 相輝，島津 裕

<再生免疫学分野 瀬原グループ>

連携教授：瀬原淳子 特定助教：佐藤文規 事務補佐員：渡邊祐子 大学院生：王 梓

<組織再生応用分野>

教授：戸口田淳也 助教：金 永輝 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 派遣職員（技術補助員）：西尾 恵，合津麻衣，岡本久美

派遣職員（事務補佐員）：稻場知愛 大学院生：前川裕継，中嶋崇貴，孫 麗萍，馬 璞純

研究員（非常勤）：鎌倉武史 共同研究者：渡辺 真，水晶善之

<臓器・器官形成応用分野>

准教授：角昭一郎 事務補佐員：上野小寿恵

大学院生：楊 心好，Priyadarshini Naskar Canning 民間等共同研究員：大蘭三千代

<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

<発生エピゲノム分野 中馬 G >

准教授：中馬新一郎 特定研究員：刀谷在美 研究員（非常勤）：細川美穂子

教務補佐員：酒井睦美 大学院生：林 瑛理，中川史之，李 京航

<統合生体プロセス分野>

教授：近藤 玄 准教授：廣田圭司 助教（兼）：渡邊仁美

<生体再建学分野>

客員教授：坂口志文 特定助教：川上竜司

研究員：大崎一直，木本富子，Chen Kelvin Yigene，藤本七恵，李 頤，金 廷任

連携研究支援員：松浦眞由美 技術補佐員：山本恵津子，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，金 英寛

技術補佐員：寒川裕之 事務補佐員：平良美智代，森山友紀恵

大学院生：安藤悠太，竹田宏典，仲尾信彦，木部善清，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，

藤本航成，山口嵩洋，山口大輝，Aizat bin MOHD AMINUDDIN，河崎貴哉，福田晃子，吉本昂希

学部生：井上立貴，末竹崇志，澤田剛，鈴木龍之介，竹本祐也，坂内遼馬

<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，上杉佳子

JSPS 特別研究員（PD）：田宮寛之 大学院生：川野紗依子，KANG JIHOON，鈴木和也，沼田章良，松枝且樹，WANG ZHE，

HAO RUOLIN，橋本みなみ，吉村安寧 学部生：各務将矢，羽田早織，山口雄大

<システムウイルス学分野>

教授：小柳義夫 講師：Alexis Vandenberg 助教：志村和也 特定助教：古瀬祐氣

特定研究員：三沢尚子 大学院生：Soper Andrew, 麻生啓文, 清水聰真, 光宗渕社, 小杉優介

共同研究者：田中 梓

<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：前田勇樹, LEE Lilith 技術補佐員：大西 翔 事務補佐員：吉田しのぶ

大学院生：貝瀬 峻, 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

共同研究者：今吉 格, 磯村彰宏, 山田真弓, 奥野浩行, 阪上起世, 楠谷智子, 林 周宏, 鈴木裕輔

外国人共同研究者：Ana Fernandes

<生体情報分野>

(欠員中)

<生体医工学分野>

(欠員中)

< RNA システム分野>

教授：大野睦人 助教：北畠 真, 谷口一郎 研究員：川本崇仁

<生体膜システム分野>

教授：秋山芳展 准教授：森 博幸 助教：檜作洋平

特定研究員：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：小柴里美 技能補佐員：辻谷晶徳, 椎葉健伸

大学院生：三宅拓也, 横山達彦, 田中雄太, 宋 俊勇, 艾 夢婷, 古味大雄, 中込悠輔

<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, 浦田悠子, 飯坂早希絵, 吉川万紀 事務補佐員：原田洋子

大学院生：阿部浩太, 井戸那奈美, 大森健太郎

<数理生物学分野>

教授：望月敦史 准教授：立川正志 研究員：小松弘和, 山内悠平 事務補佐員：矢延聰枝 共同研究員：横田弘

<幹細胞遺伝学分野>

教授：遊佐宏介 助教：樽本雄介, 西淵剛平, 青木一成 研究員：竹田潤二 教務補佐員：杉野成一

事務補佐員：上田紀子

<がん・幹細胞シグナル分野>

教授：伊藤貴浩 准教授：服部鮎奈 助教：松浦顕教 特定研究員：安井ワトソン理央

教務補佐員：森部江美子 派遣職員（事務補佐員）：片岡みわこ 派遣職員（技術補佐員）：山村香月 大学院生：王 若冲

<情報制御学分野>

客員教授：藤田尚志 連携教授：加藤博己 特定研究員：木檜 周

研究員：吳 成旭, 竹内文彦 技術補佐員：小柴里美, 加藤 悠

大学院生：AbuTayeh Ahmed, 李 受政, Khalil Jumana A.T., Emralino Francine Lianne, Saikruang Wilaiporn, Duić Ivana,

白坂勇太郎, IM Junghyun, ZUO Wenjie 研究生：覃 勉

共同研究者：船曳正英, 鬼澤秀夫, 山田辰太郎, 李 瑞波, 大音泰介, Lena Ang Yan Ping

<幹細胞デコントラクション分野>

教授：今吉格 助教：鈴木裕輔（生命科学研究科） 特定教授：磯部圭佑（生命科学研究科）

特定准教授：坂本雅行（生命科学研究科） 特定助教：山田真弓（生命科学研究科）

研究員：中野吏洋助（生命科学研究科），横山達士（生命科学研究科）

教務補佐員：松本真美（生命科学研究科）、田中真子（生命科学研究科）、倉橋むつみ（生命科学研究科）
事務補佐員：澤田英里（生命科学研究科） 大学院生：長崎真治（生命科学研究科）、立木佑宇人（生命科学研究科）、
向山佳歩（生命科学研究科）、Anita Banhidi（生命科学研究科） 研究生：Alaa Jad（生命科学研究科）

■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 特定研究員：島崎奈津子
研究生：張 原銘、王 梓涵 教務補佐員：大附 舞
大学院生：YALÇIN PISİL、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
事務補佐員：平野佐夜子 大学院生：Tan Wei Keat, Satyajit Biswas, KOVBA Anastacia

＜ウイルス共進化分野＞

准教授：宮沢孝幸
大学院生：北尾晃一、麻生志郎、住吉葵 技術補佐員：正玄裕子
研究員：田中 淳 共同研究者：松浦健二、石橋朋樹、田崎英祐

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 准教授・副施設長（兼）：角昭一郎 准教授（兼）：廣田圭司 助教：渡邊仁美
技術専門職員：出口央士 技術職員：渋谷 翔、俣野真帆 教務補佐員：永井智美
技能補佐員：竹明フサ、向 一哲、川北美奈子、高溝一郎、藤堂詩子、穴田祐子、竹内健人、竹内 宏
研究支援推進員：古賀智英、佐々木勉、吉田美保、富士原達美、新 謙一、佐治佑沙、安仁屋鳳介
事務補佐員：北澤志津江 派遣職員：西山尚之、片山龍一

■附属ヒトES細胞研究センター■

センター長（兼）：永樂元次

＜臨床基盤分野＞

・ES細胞樹立グループ

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 事務補佐員：廣富ひとみ

・ES細胞応用グループ

准教授：中馬新一郎（兼）

＜基礎技術開発分野＞

・ヒトオルガノイド開発グループ

教授：永樂元次（兼）

・再生免疫細胞療法開発グループ

教授：河本 宏（兼）

■事務部■

事務長：森田勇二 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
再雇用職員：小林英治 教務補佐員：采女久実子 事務補佐員：竹島愛美 勞務補佐員：稻垣きよみ
派遣職員：谷山佳奈美

Annual Report
of the Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University
Vol.5 2020

2021年12月1日 発行
京都大学ウイルス・再生医科学研究所



Institute for Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University