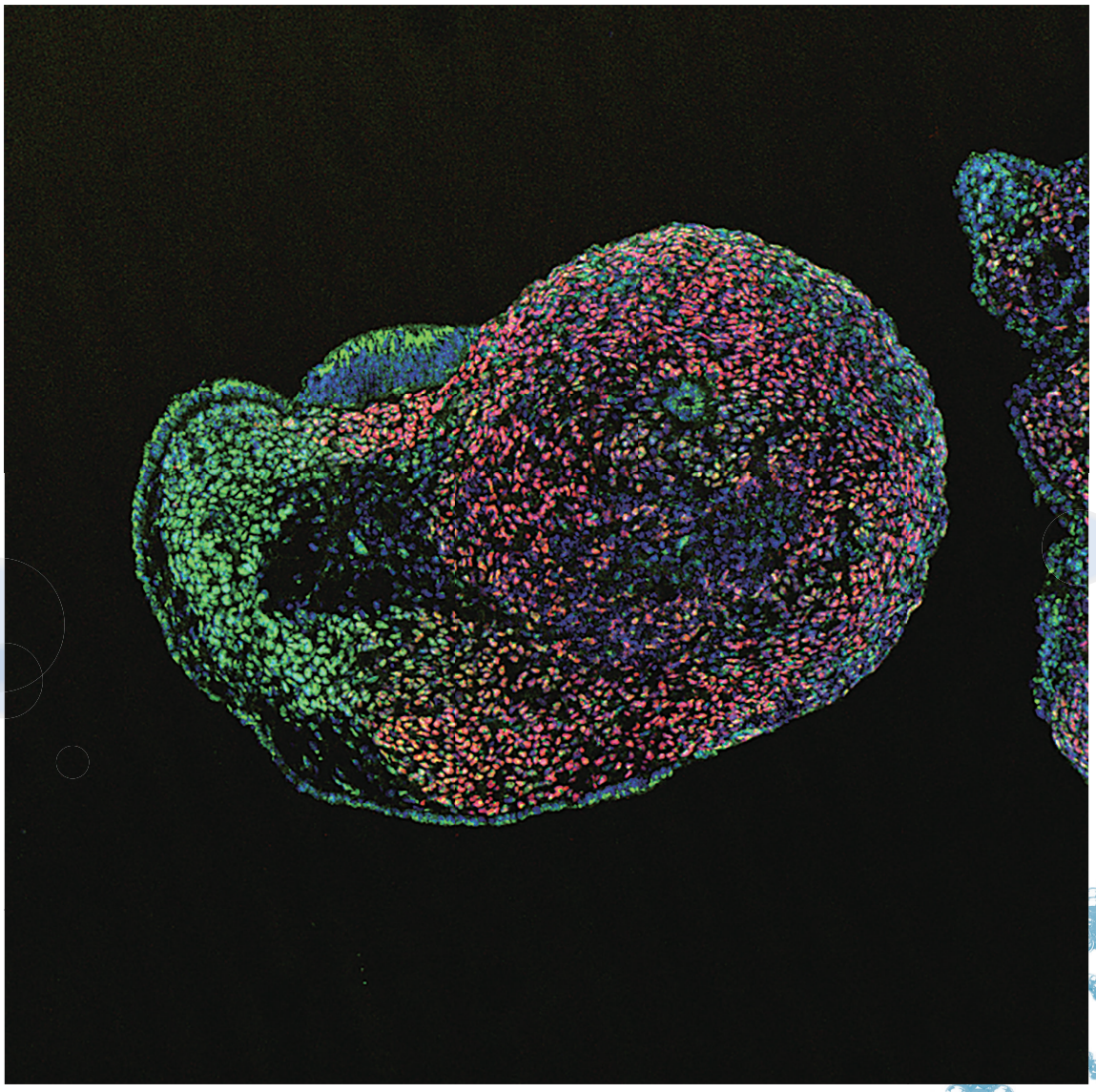
ISSN 2433-2593

Annual Report

of the Institute for
Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University Vol. 6 2021



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.6 2021

Institute for Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University

表紙：
下顎弓様に分化したヒト多能性幹細胞由来の凝集体。実際の組織における先端部マーカーである HAND2（赤色）は凝集体内の片側の領域に偏って発現する。

Cover:
Mandibular arch-like aggregate derived from human pluripotent stem cells. HAND2 (red), one of the distal-side marker, is expressed in one side of the aggregate.

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 ウイルス分野 Laboratory of RNA Viruses …… 5
微細構造ウイルス学分野 Laboratory of Ultrastructural Virology …… 13
がんウイルス分野 Laboratory of Tumor Viruses …… 19
細胞制御分野 Laboratory of Cell Regulation …… 23
免疫制御分野 Laboratory of Immune Regulation …… 27

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 …… 30
生体材料学分野 Laboratory of Biomaterials …… 36
再生免疫学分野 Laboratory of Immunology …… 47
再生増殖制御学分野（再生免疫学分野内）
Department of Growth Regulation（in Lab of Immunology） …… 54
臓器連関研究チーム Inter-Organ Communication Research Team …… 58
組織再生応用分野 Laboratory of Tissue Regeneration …… 62
発生エピゲノム分野 Laboratory of Developmental Epigenome …… 69
統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science …… 73
生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology …… 77

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 …… 83
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 …… 103
RNA システム分野 Laboratory of RNA System …… 107
生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System …… 110
組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis …… 115
数理生物学分野 Laboratory of Mathematical Biology …… 119
幹細胞遺伝学分野 Laboratory of Stem Cell Genetics …… 124
がん・幹細胞シグナル分野 Laboratory of Cell Fate Dynamics and Therapeutics …… 129
幹細胞デコンストラクション分野 Laboratory of Deconstruction of Stem Cells …… 135
情報制御分野 Laboratory of Regulatory Information …… 139

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 …… 141
ウイルス感染症モデル分野 Laboratory of Infectious Disease Model …… 145
ウイルス共進化分野 Laboratory of Virus-Host Coevolution …… 150
マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team …… 154

附属再生実験動物施設 Center for Animal Experiments …… 156

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 …… 158

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 …… 161

共同研究 …… 163

学術集会 …… 185

分野主催のセミナー …… 187

構成員名簿 …… 188

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
助　教	鈴木　干城	Assist. Prof.	Tateki Suzuki

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。2021 年においては、麻疹ウイルスによる神経感染に重要なウイルス側のアミノ酸置換と宿主側の因子を同定した。また、ムンプスウイルスに対する細胞侵入阻害剤の開発、コロナウイルスに対する感染阻害剤や広域中和抗体の開発・作用機序解明に成功した。

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

麻疹（はしか）の原因である麻疹ウイルス（MeV）及び流行性耳下腺炎（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ため、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、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。2021 年においては、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（主に 4 箇所）にアミノ酸置換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、膜融合能亢進 MeV が神経系に感染する際の宿主因子として CADM を同定した。CADM

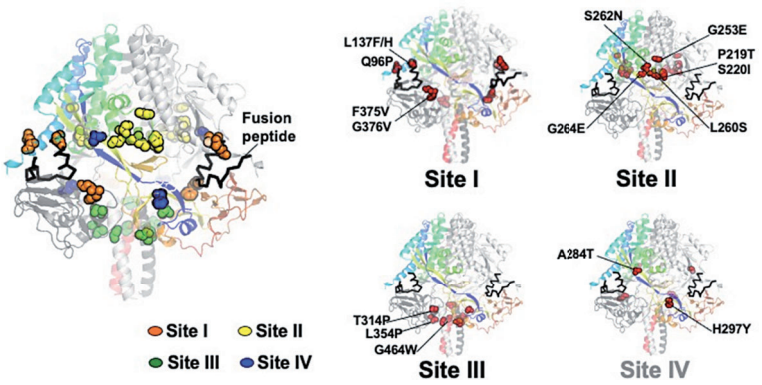


Fig. 1. Four structural regions responsible for hyperfusogenicity in the MeV-F prefusion structure.

はMeV受容体結合（H）蛋白質とシス（同一細胞上）で相互作用するという非常にユニークな特徴が確認された。また、MuVに対する細胞侵入阻害剤を糖鎖受容体の誘導体として作製、高い阻害効果を確認した。

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。2021年においては、SARS-CoV-1及びSARS-CoV-2の両方を中和する抗体NT-193を作製し、SARS-CoV-2受容体結合ドメイン（RBD）と抗体の複合体構造を決定した（Fig. 2）。その結果、抗体NT-193はACE2と同じ結合モードでRBDを認識していることが明らかとなった。SARS-CoVsは共にACE2を受容体とするため、受容体結合様式を模した結合様式がNT-193の広域中和能を可能にしていることが明らかとなった。また、SARS-CoV-2変異株に対しても中和能を示す抗体9-105の作製･性状解析や、SARS-CoV-2 3CLプロテアーゼに対する阻害化合物の同定を行った。

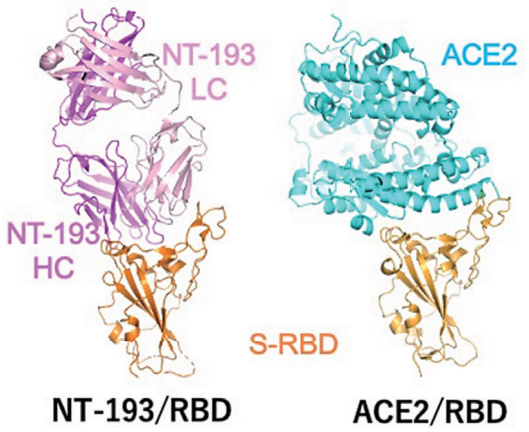


Fig. 2. Structural compariso between NT-193-RBD and ACE2-RBD.

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. In 2021, we identified amino acid substitutions on the viral side and host factors that are important for neural infection by measles virus. In addition, we successfully developed cell-entry inhibitors against mumps virus, and protease inhibitors and broad neutralizing antibodies against coronaviruses, as well as elucidated the inhibitory mechanism.

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.

The mechanisms underlying MeV and MuV infections in the central nervous system（CNS）remain largely unknown. Therefore, we studied the detailed molecular mechanisms of paramyxovirus CNS infections and integrated multidisciplinary and multi-layered research approaches to develop therapeutic agents. In 2021, through comprehensive mutagenesis experiments on the MeV fusion（F）protein, we confirmed that the amino acid substitutions at specific positions（mainly four parts）in the F protein structure cause mutant viruses with hyperfusogenic ability, resulting in neural infection（Fig. 1）. We also identified CADM as a host factor for MeV with enhanced membrane fusion ability to infect the nervous system, which is very unique in that it interacts with the MeV-H protein in *cis*（on the same cell）. In addition, inhibitors, derivatives of glycan receptors, for MuV cell entry were developed and showed high inhibitory effects.

2）Pharmaceutical 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. In 2021, an antibody NT-193 was produced that neutralizes both SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2, and the complex structure of the antibody with the SARS-CoV-2 receptor binding domain（RBD）was determined（Fig. 2）. The results revealed that antibody NT-193 recognizes the RBD in the same binding mode as ACE2, and since both SARS-CoVs utilize ACE2 as their receptor, this NT-193 binding mode mimicking the receptor binding enables broad neutralizing ability. Furthermore, we produced and characterized antibody 9-105, which exhibits broad-neutralizing ability against SARS-CoV-2 variants, and identified inhibitory compounds against the SARS-CoV-2 3CL protease.

List of Publication

Forgione, R.E., Di Carluccio, C., Milanesi, F., Kubota, M., Fabregat Nieto, F., Molinaro, A., Hashiguchi, T., Francesconi, O., Marchetti, R., and Silipo, A.（2021）. Characterization of Natural and Synthetic Sialoglycans Targeting the Hemagglutinin-Neuraminidase of Mumps Virus. **Front Chem** *9*, 711346.

Ikegame, S., Hashiguchi, T., Hung, C.T., Dobrindt, K., Brennand, K.J., Takeda, M., and Lee, B.（2021）. Fitness selection of hyperfusogenic measles virus F proteins associated with neuropathogenic

phenotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A** *118*. 10.1073/pnas.2026027118.

Hasegawa, T., Imamura, R.M., Suzuki, T., Hashiguchi, T., Nomura, T., Otsuguro, S., Maenaka, K., Sasaki, M., Orba, Y., Sawa, H., et al.（2022）. Application of Acoustic Ejection MS System to High-Throughput Screening for SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitors. **Chem Pharm Bull**（Tokyo）*70*, 199-201.

Kaku, Y., Kuwata, T., Zahid, H.M., Hashiguchi, T., Noda, T., Kuramoto, N., Biswas, S., Matsumoto, K., Shimizu, M., Kawanami, Y., et al.（2021）. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19. **Cell Rep** *36*, 109385.

Kubota, M., and Hashiguchi, T.（2021）. Unique Tropism and Entry Mechanism of Mumps Virus. **Viruses** *13*. 10.3390

Ohashi, H., Watashi, K., Saso, W., Shionoya, K., Iwanami, S., Hirokawa, T., Shirai, T., Kanaya, S., Ito, Y., Kim, K.S., et al.（2021）. Potential anti-COVID-19 agents, cepharanthine and nelfinavir, and their usage for combination treatment. **iScience** *24*, 102367.

Onodera, T., Kita, S., Adachi, Y., Moriyama, S., Sato, A., Nomura, T., Sakakibara, S., Inoue, T., Tadokoro, T., Anraku, Y., et al.（2021）. A SARS-CoV-2 antibody broadly neutralizes SARS-related coronaviruses and variants by coordinated recognition of a virus-vulnerable site. **Immunity** *54*, 2385-2398 e2310. 10.1016.

Shirogane, Y., Takemoto, R., Suzuki, T., Kameda, T., Nakashima, K., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y.（2021）. CADM1 and CADM2 Trigger Neuropathogenic Measles Virus-Mediated Membrane Fusion by Acting in cis. **J Virol** *95*, e0052821.

List of Presentations

Hashiguchi, T. Molecular mechanism of glycan receptor recognition by mumps virus. The 27th East Asia Joint Symposium, Online, Oct 27-29, 2021.

Hashiguchi, T. Structural biology of human pathogenic RNA viruses. UCLA - Kyoto University Online seminar series #2. Online, Dec. 02, 2021.

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

RNA ウイルス分野
Laboratory of RNA viruses

教　授	**朝長　啓造**	**Prof.**	**Keizo Tomonaga**
助　教	**牧野　晶子**	**Assist. Prof.**	**Akiko Makino**

本分野では、2021 年度は 4 月に特定准教授の堀江真行が退職した。

以下、本年実施された 1）実験ウイルス、2）生物情報、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）実験ウイルス領域では、「BUD23-TRMT112 とボルナ病ウイルスの L タンパク質の相互作用によるウイルスのリボ核タンパク質の染色体テザリングの媒介」「ボルナ病ウイルス 2（BoDV-2）核タンパク質による BoDV-1 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性の増強」「ボルナ病ウイルスをベースとしたエピソームベクターの物理的・化学的刺激に対する安定性」についての成果を発表した。「BUD23-TRMT112 とボルナ病ウイルスの L タンパク質の相互作用によるウイルスのリボ核タンパク質の染色体テザリングの媒介」では、大学院博士課程 4 年の Garcia が、近位依存性ビオチン化酵素によるタンパク質相互作用解析により、TRMT112 が BUD23 とともにボルナ病ウイルスの L タンパク質と相互作用することを明らかにした。またこの相互作用がウイルスの RNP の核染色体へのテザリングに関わる可能性を示した。これらの結果は核内感染戦略における宿主とウイルス相互作用の新しい展望を示すものである。「ボルナ病ウイルス 2（BoDV-2）核タンパク質による BoDV-1 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性の増強」では、大学院博士課程 4 年の神田が、BoDV-1 をベースとしたベクターの人工合成法の改良を目的として、近縁の BoDV-2 の核タンパク質（N）とリン酸タンパク質（P）が BoDV-1 の複製と人工合成に与える影響を評価した。本研究では、BoDV-2 N が BoDV-1 ポリメラーゼ活性を著しく増強し、BoDV-2 P はこの活性を N によってさらに増強することを見出した。ポリメラーゼ活性の増強に重要なアミノ酸残基として BoDV-2 N の 30 位のセリンと BoDV-2 P の 24 位のアラニンが同定された。BoDV-1 の人工合成では、BoDV-2 N を用いるだけでレスキュー効率を高めるのに十分であった。この成果は，ウイルスベクターシステムの改良だけでなく、オルソボルナウイルスポリメラーゼ活性の分子制御の理解にも貢献するものである。「ボルナ病ウイルスをベースとしたエピソーマルベクターの物理的・化学的刺激に対する安定性」では、卒業生の柳井が、BoDV-1 をベースとしたエピソーマルベクター（REVec）の凍結融解サイクル、乾燥、紫外線、温度、pH、消毒薬および実験用試薬などの条件が、非伝播型ベクターである ΔG-REVec の感染性に及ぼす影響について検討した。ΔG-REVec は凍結融解工程や 50℃以下 5 分では影響を受けず 70℃以上 5 分で不活性化され、脱水、紫外線照射により温度および時間依存的に減少した。また、ΔG-REVec は低 pH に感受性があり、一般的な条件下では化学試薬により不活性化されることが明らかとなった。これらの結果は REVec の臨床利用やバイオセーフティ管理に貢献すると考えら

れた。

2）生物情報学領域では、「公開された塩基配列データにおける隠れたウイルス配列と将来の新興感染症への警告」についての成果を発表した。「公開された塩基配列データにおける隠れたウイルス配列と将来の新興感染症への警告」では、大学院博士課程 3 年の川崎が、公開されている哺乳類と鳥類のシークエンスデータから 33 種類の RNA ウイルスファミリーの感染をスクリーニングし、約 900 種類の隠れたウイルス感染を発見した。そのうち 6 種類のウイルスゲノムをほぼ完全に同定した。これらのウイルスの中には、系統学的にヒト病原性ウイルスに近いものがあり、感染するとヒトに病気を引き起こす危険性があることが示唆された。5 つの新規ウイルスの感染が複数の個体で確認されたことから、これらのウイルスの感染がすでに自然宿主集団に広がっている可能性が示唆された。本研究は公開されたシークエンスデータがウイルス感染調査や新規ウイルス配列の同定に再利用できることを示しており、公衆衛生に対するウイルス感染症の新たな脅威を明らかにした。

3）内在性ウイルス研究領域では、「脊椎動物ゲノムに隠された 1 億年にわたるボルナウイルス感染の歴史」と「細胞生存にかかわるミトコンドリアタンパク質を発現するヒト内在性ボルナウイルスの発見」についての成果を発表した。「脊椎動物ゲノムに隠された 1 億年にわたるボルナウイルス感染の歴史」では、大学院博士課程 3 年の川崎が、969 種の真核生物ゲノム情報を用いて、ボルナウイルスに類似した遺伝子配列を探索した。その結果、1,400 以上もの内在性ボルナウイルス遺伝子座を新たに同定することに成功した（Fig. 1）。本研究では、これらの配列を用いて、進化過程でボルナウイルスの感染が起こった年代を推定し、霊長類祖先においてボルナウイルスの感染と内在化がくり返されてきたことを見出した。「細胞生存にかかわるミトコンドリアタンパク質を発現するヒト内在性ボルナウイルスの発見」では、共同研究者の麻布大学の藤野が、ヒト 3 番染色体上の内在性ボルナウイルス hsEBLN-2 の発現と機能の解明を行った。hsEBLN-2 由来タンパク質が各臓器に広く発現しており、細胞内ではミトコンドリアに局在することを示した。また、HAX-1 などのアポトーシスに関連するミトコンドリア因子と相互作用することを明らかにし、hsEBLN-2 由来 RNA をノックダウンすると、細胞の生存率が著しく低下することを証明した。

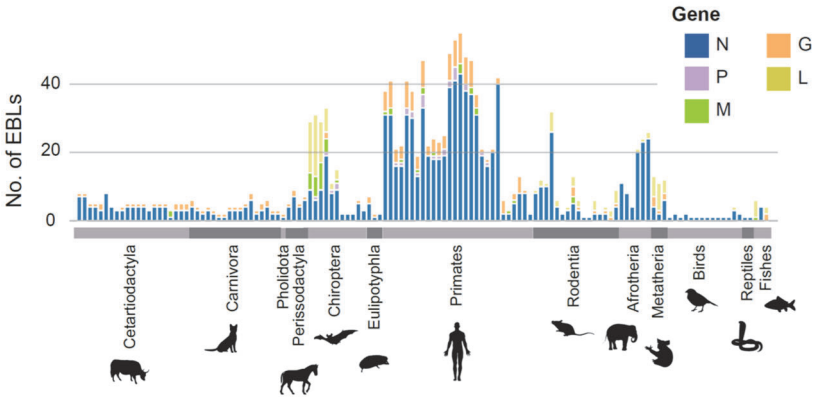


Fig.1 Numbers of EBLs in the host genomes. The bar color shows the bornaviral gene.

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

In "BUD23-TRMT112 interacts with the L protein of Borna disease virus and mediates the chromosomal tethering of viral ribonucleoproteins", we revealed that TRMT112 binds with Borna disease virus 1（BoDV-1）large（L）protein at the RNA-dependent RNA polymerase domain, together with BUD23, an 18S ribosomal RNA MTase and 40S ribosomal maturation factor by using proximity-dependent biotinylation identification（BioID）assay. We also discovered that BUD23-TRMT112 mediates the chromosomal tethering of BoDV-1 vRNPs, suggesting a new prospect of host-viral interactions for intranuclear infection strategy of orthobornaviruses.

In "The Borna disease virus 2（BoDV-2）nucleoprotein is a conspecific protein that enhances BoDV-1 RNA-dependent RNA polymerase activity", we found that BoDV-2 nucleoprotein（N）markedly enhances BoDV-1 polymerase activity and that BoDV-2 polymerase protein（P）further enhances its activity. We also identified that serine at position 30 of BoDV-2 N and alanine at position 24 of BoDV-2 P were amino acid residues important for the enhancement of polymerase activity. These results contribute not only to the improvement of bornaviral vector system but also to our understanding of the molecular regulation of orthobornavirus polymerase activity.

In "Stability of Borna disease virus-based episomal vector under physical and chemical stimulation", to acerate the clinical application of an RNA virus-based episomal vector（REVec）based on BoDV-1, we determined the fundamental properties of REVec under various physical and chemical conditions. This study investigated the effects of the following conditions on the inducibility of transmission-defective REVec: freeze-thaw cycles, dehydration, UV, temperature, pH, and reagents for virucides and laboratory experiments. Although the titer of REVec was not influenced by the freeze-thaw process or 5 minute incubation at $\leq 50^{\circ}$C, ΔG-REVec was significantly inactivated by incubation at $\geq 70^{\circ}$C for 5 minutes. These results provide important knowledge for developing the clinical use of REVec and biosafety management.

2）In the project of bioinformatics, we reported research result of following subject.

In "Hidden viral sequences in public sequencing data and warning for future emerging diseases", we screened 33 RNA viral families from publicly available mammalian and avian sequencing data and found approximately 900 hidden viral infections. We also discovered six nearly complete viral genomes in livestock, wild, and experimental animals. Some of these viruses were phylogenetically close to human-pathogenic viruses, suggesting the potential risk of causing disease in humans upon infection. Furthermore, infections of five novel viruses were identified in several different individuals. Our findings demonstrate the reusability of public sequencing data for surveying viral infections and identifying novel viral sequences, presenting a warning about a new threat of viral infectious disease to public health.

3）In the project of endogenous viruses, we reported research results of following two subjects.

In "100-My history of bornavirus infections hidden in vertebrate genomes", we systematically identified endogenous bornavirus-like elements（EBLs）in vertebrate genomes and revealed the history of bornavirus

infections over nearly 100 million years. We confirmed that ancient bornaviral infections have occurred in diverse vertebrate lineages, especially in primate ancestors（Fig.1）. EBLs in primate genomes formed clades according to their integration ages, suggesting that bornavirus lineages infected with primate ancestors had changed chronologically. Moreover, a bornaviral lineage that coexisted with primate ancestors also endogenized in the genomes of some ancestral bats. Our results suggested that long-term virus-host coexistence expanded the geographic distributions of the bornaviral lineage along with primate migration and may have spread their infections to these bat ancestors. Our findings provide insights into not only the history of bornavirus infections over geological timescales but also our perspective on virus-host coevolution.

In "A human endogenous bornavirus-like nucleoprotein encodes a mitochondrial protein associated with cell viability", we elucidated the expression and function of the endogenous bornavirus-like elements, hsEBLN-2, on chromosome 3 of the human genome. We found that hsEBLN-2-derived protein is widely expressed in various organs and localizes to mitochondria in the expressed cells. We also demonstrated that hsEBLN-2 protein interacts with mitochondrial factors related to apoptosis, such as HAX-1, and involved in the regulation of cell survival., suggesting that nonretroviral RNA viral EVEs have been coopted by hosts with more diverse functions than previously thought, showing a pivotal role for RNA virus infection in evolution.

List of Publications

Yanai M, Sakai M, Komorizono R, Makino A, Tomonaga K.（2022）. Stability of Borna disease virus-based episomal vector under physical and chemical stimulation. **Microbiol Immunol.** *66*（*1*）, 24-30

Hirai Y, Tomonaga K, Horie M.（2021）. Borna disease virus phosphoprotein triggers the organization of viral inclusion bodies by liquid-liquid phase separation. **Int J Biol Macromol.** *192*, 55-63.

Kuhn JH, Adkins S, Agwanda B, Tomonaga K. et al.（2021）2021 Taxonomic update of phylum Negarnaviricota（Riboviria: Orthornavirae）, including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. **Arch Virol.** *166*（*12*）, 3513-3566

Kanda T, Horie M, Komatsu Y, Tomonaga K.（2021）. The Borna disease virus 2（BoDV-2）nucleoprotein is a conspecific protein that enhances BoDV-1 RNA-dependent RNA polymerase activity. **J Virol.** *95*（*21*）, e0093621

Rubbenstroth D, Briese T, Dürrwald R, Horie M, Hyndman TH, Kuhn JH, Nowotny N, Payne S, Stenglein MD, Tomonaga K, Ictv ICTV Report Consortium.（2021）ICTV virus taxonomy profile: Bornaviridae. **J Gen Virol.** *102*（*7*）, 001613

Kawasaki J, Kojima S, Tomonaga K, Horie M.（2021）. Hidden viral sequences in public sequencing data and warning for future emerging diseases. **mBio.** *12*（*4*）, e0163821

Garcia BCB, Horie M, Kojima S, Makino A, Tomonaga K.（2021）. BUD23-TRMT112 interacts with the L

protein of Borna disease virus and mediates the chromosomal tethering of viral ribonucleoproteins. **Microbiol Immunol.** *65*（*11*）, 492-504.

Kawasaki J, Kojima S, Mukai Y, Tomonaga K, Horie M.（2021）. 100-My history of bornavirus infections hidden in vertebrate genomes. **Proc Natl Acad Sci USA.** *118*（*20*）, e2026235118

Fujino K, Horie M, Kojima S, Shimizu S, Nabekura A, Kobayashi H, Makino A, Honda T, Tomonaga K. A human endogenous Bornavirus-like nucleoprotein encodes a mitochondrial protein associated with cell viability. **J Virol.** *95*（*14*）, e0203020.

Horie M, Akashi H, Kawata M, Tomonaga K.（2021）. Identification of a reptile lyssavirus in Anolis allogus provided novel insights into lyssavirus evolution. **Virus Genes**. *57*（*1*）, 40-49.

Sakai M, Fujita Y, Komorizono R, Kanda T, Komatsu Y, Noda T, Tomonaga K, Makino A.（2021）. Optimal expression of the envelope glycoprotein of orthobornaviruses determines the production of mature virus particles. **J Virol.** *95*, e02221-20.

Kojima S, Yoshikawa K, Ito J, Nakagawa S, Parrish NF, Horie M, Kawano S, Tomonaga K.（2021）. Virus-like insertions with sequence signatures similar to those of endogenous non-retroviral RNA viruses in the human genome. **Proc Natl Acad Sci USA**. *118*（*5*）, e2010758118.

Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Li YT, Iwami S, Muramatsu M, Wu HL, Wada K, Tomonaga K, Watashi K, Horie M.（2021）. Identifications of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. **Virus Evol**. *7*（*1*）, veab003.

Matsunaga H, Makino A, Kato Y, Murakami T, Yamaguchi Y, Kumanogoh A, Oba Y, Fujimi S, Honda T, Tomonaga K.（2021）. Radioligand assay-based detection of antibodies against SARS-CoV-2 in hospital workers treating patients with severe COVID-19 in Japan. **Viruses** *13*（*2*）, 347.

Yamaguchi S, Nohara S, Nishikawa Y, Tomonaga K, Ueda K, Honda T.（2021）. Characterization of an active LINE-1 in the naked mole-rat genome. **Sci Rep**. *11*（*1*）, 5725.

List of Presentations

小森園亮　新規ウイルスベクター「REVec」を用いた遺伝子治療薬の開発　RINK Festival 2021、Web、2021 年 2 月 19 日

小森園亮　新規ウイルスベクター「REVec」を用いた遺伝子治療薬の開発　京都・関西発ライフサイエンスベンチャー MEETUP、Web、2021 年 3 月 5 日

Minamiyama S, Sakai M, Yamaguchi Y, Hikiami R, Wada H, Hashi M, Shodai A, Makino A, Maki T, Tomonaga K, Takahashi R, Urushitani M. A single Intrathecal injection of OPC expressing scFv against misfolded SOD1 improved ALS model rats. 第 62 回日本神経内科学会学術大会、京都、2021 年 5 月 19-22 日

Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Li Y-T, Iwami S, Muramatsu M, Wu H-L, Wada K, Tomonaga K, Watashi K, Horie M. Identification and characterization of novel deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. Global Hepatitis Summit 2021, Taipei, Taiwan, June 18-20, 2021.

川崎純菜、小嶋将平、向井八尋、朝長啓造、堀江真行　脊椎動物ゲノムに隠された 1 億年にわたるボルナウイルス感染の歴史　第 23 回日本レトロウイルス研究会 夏期セミナー、Web、2021 年 7 月 2 日

朝長啓造　希少感染症から探究するネオウイルス学　第 41 回阿蘇シンポジウム「感染症への新しいアプローチ」、熊本、2021 年 8 月 20 日

神田雄大、小森園亮、牧野晶子、朝長啓造　ボルナ病ウイルス X タンパク質がウイルス感染サイクルに与える影響の解明　第 164 回日本獣医学会学術集会、Web、2021 年 9 月 7-9 日

朝長啓造　ボルナウイルス研究とネオウイルス学　九州微生物研究フォーラム、Web、2021 年 9 月 11 日

Iwamoto M, Shibata Y, Kawasaki J, Kojima S, Li Y-T, Iwami S, Muramatsu M, Wu H-L, Wada K, Tomonaga K, Watashi K, Horie M. Identification of avian and mammalian deltaviruses provides novel insights into evolution of helper- satellite relationship. 2021 International HBV Meeting. Toronto, Canada, September 26-30, 2021.

川崎純菜　脊椎動物ゲノムに隠された 1 億年にわたるボルナウイルス感染の歴史　2021 年日本バイオインフォマティクス学会年会・第 10 回生命医薬情報学連合大会、Web、2021 年 9 月 28 日

Tomonaga K. Detection and functional elucidation of endogenous RNA viruses in the mammalian genomes. 2021 Neo-Virology Symposium, Web, September 30, 2021.

Kawasaki J, Kojima S, Mukai Y, Tomonaga K, Horie M. 100-My history of bornavirus infections hidden in vertebrate genomes. The 27th East Asia Joint Symposium, Web, October 28, 2021.

松永秀典、陸馨仙、北内京子、福本裕美　臨床試験「抗ボルナウイルス抗体陽性で難治の精神神経症状をもつ症例に対するリバビリン治療」を行った一例　第 25 回日本神経感染症学会学術大会、Web、2021 年 10 月 1-2 日

朝長啓造　鳥ボルナウイルスと鳥ボルナウイルス感染症 オンラインセミナー「鳥ボルナウイルス感染症」を知る　2021 年 10 月 30 日

川崎純菜　ウイルスの多様性を探る：公共データの再利用による RNA ウイルス配列の大規模調査　日本微生物生態学会第 34 回大会、Web、2021 年 10 月 30 日 -11 月 2 日

Kawasaki J, Kojima S, Tomonaga K, Horie M. Hidden viral sequences in public sequencing data and warning for future emerging diseases. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

Kanda T., Sakai M., Makino A., Tomonaga K. Additional expression of matrix protein and glycoprotein facilitates infectious virus production of Borna disease virus 1. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、

Web、2021 年 11 月 16-18 日

Iwata M, Horie M, Tomonaga K. Development of an in vitro system for evaluation of the integration efficiency of Borna disease virus 1 transcripts. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

Komorizono R, Kawasaki J, Makino A., Tomonaga, K. Selection and characterization of persistent infectious variants of SARS-CoV-2. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

Makino A. Host cellular machinery for SARS-CoV-2 infection. 第68回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、2021 年 11 月 16-18 日

Lin HH, Mukai Y, Komorizono R, Horie M, Tomonaga K. Investigation of the innate immune responses in Eptesicus bat cell lines. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

Mukai Y, Horie M, Tomonaga K. Borna disease virus matrix protein is incorporated into host stress granules. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

Hirai Y, Tomonaga K, Horie M. Borna disease virus organizes viral intranuclear inclusion bodies by liquid-liquid phase separation. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

Garcia BCB, Horie M, Kojima S, Tomonaga K. BUD23-TRMT112 mediates the chromosomal tethering of Borna disease virus 1 and catalyzes the m7G methylation of the viral RNA. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

Koide R, Abe T, Kamada AJ, Saito Y, Guerrini M, Fujii A, Parrish E, Horie M, Kiyonari H, Yamamoto K, Tomonaga K, Parrish NF. A mouse model to test for EVE-derived antiviral activity against Borna disease virus. 第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

酒井まどか、遊佐宏介、朝長啓造、牧野晶子　CRISPR/Cas9 システムを用いた重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 感染に関わる宿主因子の同定　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

岩本将士、柴田ゆき野、川崎純菜、小嶋将平、Yung-Tsung Li、岩見真吾、村松正道、Hui-Lin Wu、和田和宏、朝長啓造、渡士幸一、堀江真行　新規デルタウイルスの同定と性状解析により明らかとなったデルタウイルス伝播戦略の変化について　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、Web、2021 年 11 月 16-18 日

朝長啓造　ボルナウイルスと鳥ボルナウイルス感染症　オンライン獣医師セミナー「鳥ボルナウイルス感染症」を知る、Web、2021 年 11 月 26 日

岩田美智子、堀江真行、長田直樹、川崎純菜、朝長啓造　ボルナウイルスのインテグレーション効率と内在化の集団遺伝学シミュレーション解析　第 44 回日本分子生物学会年会、神奈川、2021 年 12 月 1-3 日

平井悠哉、岡村英幸、朝長啓造、堀江真行 ボルナ病ウイルスは液 - 液相分離によりウイルス性の生

体分子凝縮体を形成する 第 44 回日本分子生物学会年会、神奈川、2021 年 12 月 1-3 日

川崎純菜　オープンデータの利活用によるウイルス感染の大規模調査　山口大学微生物研究推進体第 13 回研究成果発表会、Web、2021 年 12 月 25 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。2021 年は、RNA 合成中のインフルエンザウイルスリボヌクレオタンパク質複合体の微細構造を解明し、また、ラッサウイルスの細胞侵入阻害化合物を新たに同定した。

1）RNA 合成中のインフルエンザウイルスリボヌクレオタンパク質複合体の微細構造解析

インフルエンザウイルスのリボヌクレオタンパク質複合体（vRNP）は、マイナス鎖一本鎖ゲノム RNA、核タンパク質 NP、RNA ポリメラーゼ複合体から構成されており、mRNA 合成（転写）および cRNA 合成（複製の第一段階）を担う。ウイルス粒子から精製した vRNP は二重らせん構造を形成しているが、RNA 合成中の vRNP の構造については全く解明されていなかった。そこで本研究では、高速原子間力顕微鏡（AFM）を用いて RNA 合成中の vRNP を解析することによって、微細構造学的観点からインフルエンザウイルスゲノムの転写・複製機構を明らかにすることを目的とした。初めに、ApG をプライマーとして用いた in vitro RNA 合成反応により、ウイルスより精製した vRNP から mRNA および cRNA の両方が合成されることを RT-qPCR によって確認した。次に、in vitro RNA 合成中の vRNP 複合体を高速 AFM で観察した結果、二重らせん構造を維持した vRNP が二次構造を形成した RNA と結合している様子が認められた。さらに、二重らせん構造が崩れた vRNP が二次構造を取らないループ状 RNA と結合している様子も観察された。核酸アナログおよび Click 反応を用いた手法から、二次構造を形成した RNA も二次構造を取らないループ状の RNA も、いずれも vRNP により新規に合成された RNA であることが確認された。さらに興味深いことに、ループ状 RNA はゲノム RNA と新規合成された RNA からなる二本鎖 RNA であることが明らかとなった。今回の結果から、RNA 合成中の vRNP の構造には 2 つのパターンが存在すると考えられ、一方は二重らせん構造を保っていることから正常な転写あるいは複製を、もう一方は二重らせん構造が崩れていることから RNA 合成の失敗を反映しているものと考えられる。

2）ラッサウイルスの感染を阻害する新たな化合物の同定

アレナウイルス科の哺乳類アレナウイルス属に分類されるラッサウイルスは、齧歯類を自然宿主とし、ヒトにラッサ熱を引き起こす。ラッサ熱は主に西アフリカで流行を繰り返し、毎年 30 万人が罹患、5 千人が死亡している。ラッサウイルスの取扱いはその高い病原性のため、バイオセーフティレベル 4（BSL-4）施設にのみ制限される。そのため、ラッサウイルスに関する研究は不十分であり、承認された抗ラッサウイルス薬は未だ存在しない。本研究では、抗ラッサウイルス薬開発に資することを目指し、京都大学が保有する機能既知の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。その結果、ABC トランスポーターである P-glycoprotein（P-gp）の特異的阻害薬として知られる CP100356 塩酸塩（CP100356）を同定した。また、CP100356 はラッサウイルスの糖タンパク質 GP を発現する組み換えウイルス（VSV-LASVGP）やリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）の細胞への吸着は阻害しなかったが、ラッサウイルスおよび LCMV の糖タンパク質 GP が示す低 pH 依存的な膜融合能を阻害した。さらに、CP100356 が哺乳類アレナウイルスのシュードタイプウイルスに対して幅広い抗ウイルス効果を示した。これらの結果から、CP100356 は様々な哺乳類アレナウイルスに対して有効な、汎抗アレナウイルス薬の候補化合物になることが示唆された。

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 2021, we analyzed ultrastructure of influenza A virus ribonucleoprotein complex during RNA synthesis. Furthermore, we identified a new compound, CP-100356 monohydrochloride（CP100356）, that inhibits the cell entry of Lassa virus.

1）Ultrastructure of influenza virus ribonucleoprotein complexes during viral RNA synthesis

The influenza A virus genome is composed of eight segmented single-stranded negative-sense RNAs（vRNAs）. Each vRNA is encapsidated by multiple nucleoproteins（NPs）and an RNA-dependent RNA polymerase to form a ribonucleoprotein complex（vRNP）. The vRNP shows a twisted rod-shaped configuration, where an NP-vRNA strand is folded back and coiled on itself to form a double-stranded helix. The vRNA is either transcribed into mRNA or replicated into complementary RNA（cRNA）while complexed with RNPs. However, the configuration of vRNPs while performing these functions remains unknown. Here, we first isolated vRNPs from influenza A virions and confirmed by RT-qPCR that the vRNPs were able to produce both mRNA and cRNA in vitro. Then, we analyzed the configuration of vRNPs during an in vitro RNA synthesis reaction by using high-speed atomic force microscopy（HS-AFM）. Two different vRNP configurations associated with newly synthesized RNAs were observed. The vRNPs associated with folded RNA had a twisted rod-shaped configuration similar to vRNPs not undergoing RNA synthesis. In contrast,

vRNPs associated with a looped RNA were deformed and did not retain their helical configuration. In addition, it was demonstrated that the looped RNA was double-stranded, and composed of a template vRNA and a progeny cRNA. These results suggest that while some vRNPs keep their helical structures during RNA synthesis, for the repeated cycle of RNA synthesis, others become structurally deformed, which likely results in failure to continue RNA synthesis. Thus, our findings provide the ultrastructural feature of vRNPs during RNA synthesis.

2）Identification of the new compound that inhibits Lassa virus infection.

Lassa virus（LASV）—a member of the family *Arenaviridae*—causes Lassa fever in humans and is endemic in West Africa. Currently, no approved drugs are available. We screened 2480 small compounds for their potential antiviral activity using pseudotyped vesicular stomatitis virus harboring the LASV glycoprotein（VSV-LASVGP）and a related prototypic arenavirus, lymphocytic choriomeningitis virus（LCMV）. Follow-up studies confirmed that CP100356 hydrochloride（CP100356）, a specific P-glycoprotein（P-gp）inhibitor, suppressed VSV-LASVGP, LCMV, and LASV infection without significant cytotoxicity. Although CP100356 did not block receptor binding at the cell surface, it inhibited low-pH-dependent membrane fusion mediated by arenavirus glycoproteins. P-gp downregulation did not cause a significant reduction in either VSV-LASVGP or LCMV infection, suggesting that P-gp itself is unlikely to be involved in arenavirus entry. Finally, our data also indicate that CP100356 inhibits the infection by other mammarenaviruses. Thus, our findings suggest that CP100356 can be considered as an effective virus entry inhibitor for LASV and other highly pathogenic mammarenaviruses.

List of Publications

Martí, M., Tuñón-Molina. A., Aachmann, F.L., Muramoto, Y., Noda, T., Takayama, K., Serrano-Aroca, Á.（2021）Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. **Polymers** *13*, 207.

Shoji, M., Sugimoto, M., Matsuno, K., Fujita, Y., Mii, T., Ayaki, S., Takeuchi, M., Yamaji, S., Tanaka, N., Takahashi, E., Noda, T., Kido, H., Tokuyama, T., Tokuyama, T., Tokuyama, T., Kuzuhara, T.（2021）A novel aqueous extract from rice fermented with Aspergillus oryzae and Saccharomyces cerevisiae possesses an anti-influenza A virus. **PLoS One** *16*, e0244885.

Sakai, M., Fujita, Y., Komorizono, R., Kanda, T., Komatsu, Y., Noda, T., Tomonaga, K., Makino, A.（2021）Optimal Expression of the Envelope Glycoprotein of Orthobornaviruses Determines the Production of Mature Virus Particles. **J Virol.** *95*, e0221-20.

Nojima, S.*, Fujita, Y.*, Kimura, K. T., Nomura, N., Suno, R., Morimoto, K., Yamamoto, M., Noda, T., Iwata, S., Shigematsu, H., Kobayashi, T. * These authors contributed equally.（2021）Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein. **Structure** *29*, 252-260.

Megaly, A.M.A., Yoshimoto, Y., Tsunoda, Y., Miyashita, M., Abdel-Wahab, M., Nakagawa, Y., Miyagawa, H.（2021）Characterization of 2 linear peptides without disulfide bridges from the venom of the spider Lycosa poonaensis（Lycosidae）. **Biosci Biotech Biochem.** *85*, 1348-1356.

Shinoda, H., Taguchi, Y., Nakagawa, R., Makino, A., Okazaki, S., Nakano, M., Muramoto, Y., Takahashi, C., Takahashi, I., Ando, J., Noda, T., Nureki, O., Nishimasu, H., Watanabe, R.（2021）Amplification-free RNA detection with CRISPR–Cas13. **Commun Biol.** *4*, 476.

Sano, E., Deguchi, S., Sakamoto, A., Mimura, N., Hirabayashi, A., Muramoto, Y., Noda, T., Yamamoto, T., Takayama, K.（2021）Modeling SARS-CoV-2 infection and its individual differences with ACE2-expressing human iPS cells. **iScience** *24*, 102428.

Nakano, M., Sugita, Y., Kodera, N., Miyamoto, S., Muramoto, Y., Wolf, M., Noda, T.（2021）Ultrastructure of influenza virus ribonucleoprotein complexes during viral RNA synthesis. **Commun Biol.** *4*, 858.

Kaku, Y., Kuwata, T., Zahid, H.M., Hashiguchi, T., Noda, T., Kuramoto, N., Biswas, S., Matsumoto, K., Shimizu, M., Kawanami, Y., Shimura, K., Onishi, C., Muramoto, Y., Suzuki, T., Sasaki, J., Nagasaki, Y., Minami, R., Motozono, C., Toyoda, M., Takahashi, H., Kishi, H., Fujii, K., Tatsuke, T., Ikeda, T., Maeda, Y., Ueno, T., Koyanagi, Y., Iwagoe, H., Matsushita, S.（2021）Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19. **Cell Rep.** *36*, 109385.

Hatakeyama, D., Shoji, M., Ogata, S., Masuda, T., Nakano, M., Komatsu, T., Saitoh, A., Makiyama, K., Tsuneishi, H., Miyatake, A., Takahira, M., Nishikawa, E., Ohkubo, A., Noda, T., Kawaoka, Y., Ohtsuki, S., Kuzuhara, T.（2021）Acetylation of the influenza A virus polymerase subunit PA in the N-terminal domain positively regulates its endonuclease activity. **FEBS J.** *289*, 231-245.

Tuñón-Molina, A., Martí, M., Muramoto, Y., Noda, T., Takayama, K., Serrano-Aroca, Á.（2021）Antimicrobial Face Shield: Next Generation of Facial Protective Equipment against SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria. **Int J Mol Sci.** *22*, 9518.

Cano-Vicent, A., Tuñón-Molina, A., Martí, M., Muramoto, Y., Noda, T., Takayama, K., Serrano-Aroca, Á.（2021）Antiviral Face Mask Functionalized with Solidified Hand Soap: Low-Cost Infection Prevention Clothing against Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2. **ACS Omega.** *6*, 23495-23503.

Takenaga, T., Zhang, Z., Muramoto, Y., Fehling, S.K., Hirabayashi, A., Takamatsu, Y., Kajikawa, J., Miyamoto, S., Nakano, M., Urata, S., Groseth, A., Strecker, T., Noda, T.（2021）CP100356 Hydrochloride, a P-Glycoprotein Inhibitor, Inhibits Lassa Virus Entry: Implication of a Candidate Pan-Mammarenavirus Entry Inhibitor. **Viruses** *13*, 1763.

Liu, S-S., Jin, F., Liu, Y-S., Murakami, Y., Sugita, Y., Kato, T., Gao, X-D, Kinoshita, T., Hattori, M., Fujita, M.（2021）Functional Analysis of the GPI Transamidase Complex by Screening for Amino Acid Mutations in Each Subunit. **Molecules** *26*, 5462.

Takayama, K., Tuñón-Molina, A., Cano-Vicent, A., Muramoto, Y., Noda, T., Aparicio-Collado, J.L., Sabater, I. Serra, R., Martí, M., Serrano-Aroca, Á.（2021）Non-Woven Infection Prevention Fabrics Coated with Biobased Cranberry Extracts Inactivate Enveloped Viruses Such as SARS-CoV-2 and Multidrug-Resistant Bacteria. **Int J Mol Sci.** *22*, 12719.

中野雅博、野田岳志（2021）ウイルス RNA 合成装置の微細構造解析 実験医学増刊「パンデミック時代の感染症研究」（羊土社）

武長徹、張子涵、野田岳志（2021）ラッサウイルスの細胞侵入阻害薬の開発 生体の科学 特集「グローバル時代の新興再興感染症への科学的アプローチ」

List of presentations

Yukihiko Sugita. Cryo-EM at Kyoto University. Cryo-Electron Microscopy Course at OIST FY2020, Okinawa, Japan, 16 February, 2021（招待講演）

杉田征彦　クライオ電子顕微鏡を用いた病原 RNA ウイルスの構造解析　日本顕微鏡学会 第 77 回学術講演会 S-7 最先端顕微鏡技術により明らかになった微生物の仕組み、多様性、筑波・オンライン、2021 年 6 月 14 日（招待講演）

杉田征彦　単粒子解析法による螺旋構造解析　第 21 回日本蛋白質科学会年会、オンライン、2021 年 6 月 18 日、（招待講演）

Yukihiko Sugita. Structural analyses on pathogenic RNA viruses using cryo-EM. 第 59 回 日本生物物理学会年会 ASB-BSJ Joint Symposium, オンライン , 27 November, 2021（招待講演）

杉田征彦、野田岳志　京都大学ウイルス・再生医科学研究所におけるクライオ電顕施設の紹介　第 44 回 日本分子生物学会年会 第 4 回クライオ電顕ネットワーク・ユーザーグループミーティング、横浜、2021 年 12 月 2 日（招待講演）

胡上帆　Potential role of tight junction protein Claudin-1 in LCMV cell-to-cell transmission　第一回高病原性ウイルス研究会、オンライン、2021 年 4 月 19 日

張子涵　ラッサウイルス侵入阻害薬の探索　第一回高病原性ウイルス研究会、オンライン、2021 年 4 月 19 日

梶川純一　アレナウイルス感染細胞におけるオートファジー誘導を介した細胞死の回避　第一回高病原性ウイルス研究会、オンライン、2021 年 4 月 19 日

寿野良二、杉田征彦、森本和志、辻本浩一、廣瀬未果、寿野千代、野村紀通、岩崎憲治、加藤貴之、岩田想、小林拓也　ヒトプロスタグランジン E2 受容体 EP3-G タンパク質複合体のクライオ電子顕微鏡単粒子解析　第 21 回日本蛋白質科学会年会、オンライン、2021 年 6 月 18 日

Masahiro Nakano, Junichi Kajikawa, Sho Miyamoto, Chiho Ohnishi, Yukiko Muramoto, and Takeshi Noda Roles of non-structural proteins against production of double-stranded RNA in influenza virus-infected

cells　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、神戸・オンライン、2021 年 11 月 16-18 日

Shangfan Hu, Yoko Fujita, Yukihiko Sugita, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda　Cryo-EM structure of Lloviu cuevavirus nucleoprotein-RNA complex　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、神戸・オンライン、2021 年 11 月 16-18 日

梶川純一、平林愛、宮本翔、高松由基、胡上帆、野澤孝志、中川一路、浦田秀造、安田二朗、遊佐宏介、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志　オートファジー誘導によるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染細胞の細胞死回避　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、神戸・オンライン、2021 年 11 月 16-18 日

張子涵、武長徹、村本裕紀子、Sarah Katharina Fehling、平林愛、髙松由基、梶川純一、宮本翔、中野雅博、浦田秀造、Allison Groseth、Thomas Strecker、野田岳志　エストロゲン受容体作動薬はラッサウイルスの細胞侵入を阻害する　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、神戸・オンライン、2021 年 11 月 16-18 日

藤田陽子、杉田征彦、髙松由基、祝部和也、五十嵐学、角田優伍、村本裕紀子、中野雅博、野田岳志　マールブルグウイルス 核タンパク質 -RNA 複合体の構造解析　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、神戸・オンライン、2021 年 11 月 16-18 日

藤田陽子、野田岳志 マールブルグウイルスの構造を視る・識る・活かす　ウイルス学若手研究集会 2021、オンライン、2021 年 12 月 10 日

梶川 純一、野田 岳志 宿主オートファジーを介したアレナウイルス持続感染機構の解明　ウイルス学若手研究集会 2021、オンライン、2021 年 12 月 11 日

山内康司、藤田陽子、杉田征彦、齊藤慎二、鈴木忠樹、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志 多量体 IgA 抗体によるインフルエンザウイルス中和機構の解明を目指して　ウイルス学若手研究集会 2021、オンライン、2021 年 12 月 11 日

武長徹、張子涵、村本裕紀子、Sarah Katharina Fehling、平林愛、高松由基、梶川純一、宮本翔、中野雅博、浦田秀造、Allison Groseth、Thomas Strecker、野田岳志　ラッサウイルスの細胞侵入阻害薬の探索　第 12 回スクリーニング学研究会、オンライン、2021 年 12 月 26 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

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】

酒井グループはレトロウイルス研究に始まり、現在はヒトパピローマウイルス（HPV）の研究を行っている。また理学研究科より、坂田祥馬さんが実験補助として参加している。

1）HPV 複製に関する研究

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）HPV 感染による腫瘍形成機構の解析

HPV 感染による疣贅やコンジローマなどの良性腫瘍形成、さらにその悪性転換の分子機構に関して、主にヒト皮膚モデル培養系を利用して解析を行った。

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）The mechanisms of tumor formation induced by HPV infection

The molecular mechanisms of tumor formation and cancer progression induced by HPV infection are

analyzed with human skin-model culture system.

【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。これまで細胞内の親電子分子などによって活性化され、これらの分子を無毒化する遺伝子の発現を誘導する転写因子である Nrf2 の活性化剤として知られる Bardoxolone methyl（BARD）が、HCV ゲノム複製を抑制することを明らかにしている。この薬効機構を明らかにするために、この HCV サブゲノムレプリコン複製細胞を BARD 処理することで発現が変化する遺伝子を RNA-Seq 法を用いて解析した。この解析によって得られた候補遺伝子について siRNA を用いた発現の修飾を行い、HCV ゲノム複製に関与する可能性のある新規遺伝子をいくつか見出した。

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 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 がその塩基配列あるいはその二次構造に依存して分解されることを見出している。BARD の薬効機構を明らかにするために、この HBV 複製細胞を BARD 処理することで発現が変化する遺伝子を RNA-Seq 法を用いて解析した。この解析によって得られた候補遺伝子について siRNA を用いた発現の修飾を行い、HBV ゲノム複製に関与する可能性のある新規遺伝子をいくつか見出した。

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

1）Analysis of molecular mechanism of anti-HCV effect by bardoxolone methyl

We reported that bardoxolone methyl（BARD）, an activator of Nrf2, significantly suppressed the replication of HCV genome. Since Nrf2 is the transcription factor activated by electrophilic molecules in the cells and is known to induce a large number of cellular genes, we intended to find the cellular gene induced by BARD and is contributing the suppression of HCV genome replication. RNA seq analysis were performed using the total RNAs from HCV subgenomic replicon bearing cells with and without BARD treatment. We found that the many genes induced by BARD. Suppression of the gene by siRNA strategy showed the genes possibly contribute to BARD dependent suppression of HCV genome replication.

2）Study of the cellular genes contribute to anti-HBV effect by bardoxolone methyl

We have observed that bardoxolone methyl（BARD）, an activator of Nrf2, significantly reduced the amounts of HBV pregemonic RNA（pgRNA）, through the HBV pgRNA degradation. Since Nrf2 is the transcription factor activated by electrophilic molecules in the cells and is known to induce a large number of cellular genes, we intended to find the cellular gene induced by BARD and is contributing the suppression of HBV genome replication. RNA seq analysis were performed using the total RNAs from HBV genome replicating cells with and without BARD treatment. We found that the many genes induced by BARD. Suppression of the gene by siRNA strategy showed the genes possibly contribute to BARD dependent induction of HBV pgRNA degradation.

List of Publications

Ohya K., Immamua M., Teraoka Y., Uchida T., Fujino H., Nakahara T., Ono A., Murakami E., Yamauchi M., Kawaoka T., Miki D., Tsuge M., Chayama-Abe H., Nelson Hayes C., Aikata H., Ishida Y., Tateno C., Song, H-J., Miyayama Y., Hijikata M., Chayama K.: Novel drug resistance-associated substitutions against pibrentasvir emerged in genotype 1b hepatitis C virus-infected human hepatocyte transplanted mice, **Biophys.Biochem. Res. Commun.,** 2021, Jun 25;559:78-83. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.062.

List of Presentation

Uchida T., Imamura M., Teraoka Y., Fujino H., Nakahara T., Ono A., Murakami E., Yamauchi M., Kawaoka T., Miki D., Abe-Chayama H., Nelson Hayes C., Aikata H., Ishida Y., Tateno C., Song H-J, Miyayama Y., Hijikata M., Chayama K.: Novel resistance-associated substitutions against pibrentasvir emerged in genotype 1b HCV-infected mice. The Digital International Cogress 2021 American Association for the Study of Liver Diseases 2021.

Uchida T., Imamura M., Teraoka Y., Fujino H., Nakahara T., Ono A., Murakami E., Yamauchi M., Kawaoka T., Miki D., Abe-Chayama H., Nelson Hayes C., Aikata H., Ishida Y., Tateno C., Song H-J, Miyayama Y., Hijikata M., Chayama K.: Emergence of novel resistance-associated substitutions against

pibrentasvir in genotype 1b HCV-infected mice. Asian Pacific Association for the Study of the Liver, single topic conference, 9/2-3 Osaka city university 2021.

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、N ミリストイル化ウイルスタンパク質に由来するリポペプチドを標的とした新しい免疫応答を発見し、その基盤の解明を進めている。本年度は、アカゲザルエイズモデルの研究をヒトへと展開し、ヒトリポペプチド結合分子を同定するとともに、その構造を解明した。他方、結核肉芽種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 分子と Cox2 経路の連動を主軸とした慢性炎症の制御機構の解明へと発展した。

1）N ミリストイル化リポペプチドを結合するヒト MHC（HLA）クラス 1 分子の同定

本研究分野では、アカゲザルエイズモデルの免疫解析（J. Immunol. 2011, J. Virol. 2013）を起点として、ウイルスリポペプチドを認識する細胞傷害性 T 細胞の存在を明らかにし、リポペプチド認識の分子機構の解明を進めてきた。すでに N- ミリストイル化リポペプチドを結合し T 細胞に提示する新たなアカゲザル MHC クラス 1 分子群（Mamu-B*098, Mamu-B*05104）を同定し、リポペプチドを結合した複合体の X 線結晶構造解析からリポペプチド結合の分子機構を明らかにした（Nat. Commun. 2016, J. Immunol. 2019）。さらに、リポペプチドを結合した Mamu-B*05104 複合体と特異的 T 細胞受容体の共結晶構造の解明に成功し、リポペプチド固有の構造であるミリストイル化グリシンのアミド結合が重要な T 細胞エピトープとして機能することを明らかにした（Int. Immunol. 2020）。加えて、アカゲザルエイズモデルや Mamu-B*098 トランスジェニックマウスを用いた個体解析から、ウイルスリポペプチドを認識する細胞傷害性 T 細胞が感染防御に重要な役割を担う可能性が示唆されつつある（J. Immunol. 2011, J. Biol. Chem. 2020）。他方、ヒトにおけるリポペプチド提示分子の存在や機能は未だ明らかにされていない。

ヒト MHC クラス 1 遺伝子座を構成する HLA-A,B,C は、高度の多型性を有しており、現在までに 10,000 種類を超える対立遺伝子が報告されている。まず、この中から、アカゲザルリポペプチド提示 MHC クラス 1 分子に共通のユニークな構造とアミノ酸配列を手掛かりとしてリポペプチド結合 HLA クラス 1 候補アリルを絞り込んだ。そして、MHC クラス 1 分子がリガンド依存的に安定的な複合体を形成することを利用して、緩衝液中で各候補アリルとリポペプチドとの複合体形成実験を行い、リポペプチド依存的に複合体が安定化する HLA クラス 1 分子群を選抜した。このうち HLA-A と HLA-C に属するそれぞれ 1 アリルについて X 線結晶構造解析を行い、1）リポペプチドが抗原結

合溝に結合すること、2）ミリスチン酸とC末端アミノ酸がアンカーとして機能し、それぞれBポケットとFポケットに収容されることを明らかにした。これらの基本的な結合様式はアカゲザルリポペプチド提示分子と共通であった。他方、アカゲザルリポペプド結合分子と異なり、これらのヒトリポペプチド結合分子はリポペプチドとペプチドをともに結合する能力を有することから、リポペプチド結合複合体とペプチド結合複合体の結晶構造の比較検討を行った。その結果、リガンドを収納するBポケットの一部の構成アミノ酸がその側鎖の配向を変化させることにより、ポケット構造や水素結合ネットワークが再構築され、ポケットの大きさや疎水性環境がリガンドの種類に応じて最適化されることを見出した。これらの成果は現在投稿中である。

2）好中球S100A9によるマクロファージ極性化制御機構

本研究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的として、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。M2マクロファージの誘導に関わる好中球S100A9シグナルは、プロスタグランジン合成酵素であるCox2の発現調節を行うことが明らかとなったが、その詳細な分子機序は不明であった。今年度、BCG感染個体から単離した好中球を用いた分子生物学解析から、細胞質S100A9がCox2遺伝子プロモーターのヒストンアセチル化を制御することを突き止めた。また、Cox2に対する特異的阻害剤（セレコキシブ）をモルモット結核モデルに投与することで、肉芽腫深部に誘導されるM2マクロファージが阻害された。肉芽腫M2マクロファージは、結核菌リザーバーとして持続感染の温床になることが示されており、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。4T1乳癌細胞を用いたマウス担がんモデルでは、接種部位におけるがんの増殖及び肺転移率が、野生型に比してA9KOマウスで抑制された。さらに、A9KOマウスの癌接種後の生存率が野生型マウスに比べて亢進されることを見出した（Fig. 1）。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

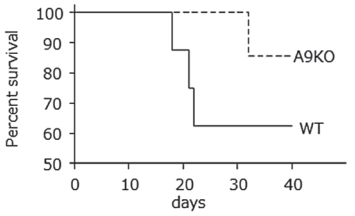


Fig. 1. Kaplan–Meier plot of survival in tumor-bearing WT and A9KO mice. Balb/c WT or A9KO mice were inoculated subcutaneously in the mammary fat pad with 4T1 breast cancer cells (5×10^5) at day 0 and monitored for survival（n = 8).

の分子機構の解明に向けた研究を展開している。

1）Discovery of lipopeptide-binding HLA class I molecules

Our initial finding that retroviral lipopeptide-specific cytotoxic T-lymphocytes（CTLs）expand in the circulation of SIV-infected monkeys（J. Immunol. 2011, J. Virol. 2013）was followed by the discovery of rhesus lipopeptide-presenting MHC class I molecules（Mamu-B*098 and Mamu-B*05104）（Nat. Commun. 2016; J. Immunol. 2019）. Lipopeptide-specific CTLs recognize the amide group of the N-myristoylated glycine residue, a molecular component which is absent in conventional peptides（Int. Immunol. 2020）. Therefore, lipopeptide-specific and peptide-specific CTLs may mediate distinct pathways for host defense against viral infection, as suggested by analysis of SIV-infected monkeys（J. Immunol. 2011, J. Biol. Chem. 2020）. It is now critical to address whether such CTLs exist in humans to advance our understanding of human diseases. By the use of database information, we collected an array of HLA class I allomorphs as potential lipopeptide-binding proteins, which were then assessed for their lipopeptide-binding ability in ligand-induced complex formation experiments. These selected HLA class I molecules exhibited the capacity of binding peptides besides lipopeptides, which contrasted sharply with Mamu-B*098 and Mamu-B*05104 that bound only lipopeptides, but not peptides; therefore, we further determined crystal structures of representative HLA-A and HLA-C allomorphs in a form complexed with either lipopeptides or conventional peptides. These structural analyses provided evidence for dynamic remodeling of the pocket structure and hydrogen-bond network upon peptide and lipopeptide binding（manuscript submitted）.

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, thereby promoting M2 polarization. We also detected that translocation of S100A9 from the cytosol to the nucleus was upregulated in neutrophils by BCG infection. Chromatin

immunoprecipitation with anti-S100A9 antibody revealed that S100A9 bound the specific region of the Cox2 gene promoter, suggesting S100A9 played the new role as a co-transcriptional factor. In addition, experiments with the Cox2 inhibitor Celecoxib in BCG-infected guinea pigs suggested that the S100A9/Cox2 axis proved to be essential for the induction of granuloma-associated M2 macrophages. 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

Iizasa E, Chuma Y, Uematsu T, Kubota M, Kawaguchi H, Umemura M, Toyonaga K, Kiyohara H, Yano I, Colonna M, Sugita M, Matsuzaki G, Yamasaki S, Yoshida H, Hara H.（2021）. TREM2 is a receptor for non-glycosylated mycolic acids of mycobacteria that limits anti-mycobacterial macrophage activation. **Nat. Commun.** *12*, 2299.

森田大輔、杉田昌彦（2021）. リポペプチドを認識する新たなＴ細胞　**炎症と免疫** *29*, 311-313.

泉澤文子、水谷龍明、浦田秀造（2021）. ラッサウイルス・エボラウイルスに対する創薬研究　**生体の科学** *72*（*4*）, 326-329.

List of Presentations

Morita D, and Sugita M. Crystal structure of the ternary complex of TCR, MHC class I and lipopeptides. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nara, December 8-10, 2021.

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）リンパ球前駆細胞と免疫細胞のリンパ器官内ニッチにおける IL-7 と IL-15 の役割

リンパ器官とリンパ組織は免疫細胞とストローマ細胞から構成される。ストローマ細胞は、免疫細胞の発生、維持、応答を助けるさまざまなサイトカインを産生する。ストローマ細胞から産生される IL-7 と IL-15 は、リンパ球と自然リンパ球の発生と維持に必須のサイトカインである。さらに、IL-7 はリンパ器官の形成にも必要である。しかしながら、生体内における IL-7 と IL-15 の濃度が非常に低いため、これまでその発現を直接検出することは困難であった。最近になって、いくつかの研究グループが IL-7 と IL-15 のレポーターマウスの作製に成功した。予想されたように、IL-7 と IL-15 は骨髄やリンパ節の間葉系ストローマ細胞と胸腺上皮細胞で検出された。さらに、IL-7 はリンパ管内皮細胞で、IL-15 は血管内皮細胞で特異的に発現していた。さらに、複数の研究グループが細胞特異的な IL-7 欠損マウスと IL-15 欠損マウスを用いて、IL-7 と IL-15 の組織局所における機能を明らかにしている。例えば、CXCL12 を発現する骨髄間葉系ストローマ細胞が産生する IL-7 が、初期 B 前駆細胞の主なニッチとなっていることが示されてた。また、単一細胞 RNA-seq 解析によってリンパ器官の複数のストローマ細胞亜集団において IL-7 と IL-15 が発現していることも明らかになった。今後は、自然リンパ球と NK 細胞の前駆細胞のニッチを構成するストローマ細胞が同定されることが期待される。

Interleukin-7（IL-7）is a cytokine important for differentiation and maintenance of lymphocytes. Focusing on IL-7 and IL-7 receptor（IL-7R）, our laboratory is 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）The roles of IL-7 and IL-15 in niches for lymphocyte progenitors and immune cells in lymphoid organs

Lymphoid organs and tissues consist of different types of immune cells and stromal cells. The stromal cells constitute the niche or microenvironment for the immune cells and produce various cytokines that support the development, maintenance, and response of the immune cells. IL-7 and IL-15 are the major cytokines produced by stromal cells and are essential for the development and maintenance of lymphocytes and innate lymphoid cells. In addition, IL-7 is essential for the organogenesis of lymphoid organs. However, because the amount of these two cytokines in vivo is very low, it has been difficult to directly detect their expression. Recently, several groups succeeded in establishing IL-7- and IL-15-reporter mouse lines. As expected, IL-7 and IL-15 were detected in mesenchymal stromal cells in the bone marrow and lymph nodes and in epithelial cells in the thymus. Furthermore, IL-7 and IL-15 were differentially expressed in lymphatic endothelial cells and blood endothelial cells, respectively. In addition to their expression, many groups have analyzed the local functions of IL-7 and IL-15 by using cell type-specific IL-7- and IL-15-deficient mice. From these experiments, CXCL12-expressing mesenchymal stromal cells were identified as the major niche for early B cell precursors. Single cell RNA sequencing analysis has revealed different subpopulations of stromal cells in the lymphoid organs, including those that express both IL-7 and IL-15. Future research is still needed to elucidate which stromal cells serve as the niche for the early precursors of innate lymphoid cells and NK cells in the bone marrow.

List of Publications

Kawakita, M., Oyama, T., Shirai, I., Tanaka, S., Araki, K., Abe, S., Asahi, T., Cui, G., Itoh, F., Sasaki, M., Shibata, N., Ikuta, K., Hatakeyama, T., and Takahara, K.（2021）. Cell wall N-glycan of *Candida albicans* ameliorates early hyper- and late hypo-immunoreactivity in sepsis. **Commun. Biol.**, 4: 342.

Kuwano, T., Izumi, H., Aslam, M. R., Igarashi, Y., Bilal, M., Nishimura, A., Watanabe, Y., Nawaz, A., Kado, T., Ikuta, K., Yamamoto, S., Sasahara, M., Fujisaka, S., Yagi, K., Mori, H., Tobe, K.（2021）. Generation and characterization of a *Meflin*-CreER^{T2} transgenic line for lineage tracing in white adipose tissue. **PLoS One**, 16: e0248267.

Adachi, A., Honda, T., Dainichi, T., Egawa, G., Yamamoto, Y., Nomura, T., Nakajima, S., Otsuka, A., Maekawa, M., Mano, N., Koyanagi, N., Kawaguchi, Y., Ohteki, T., Nagasawa, T., Ikuta, K., Kitoh, A., and Kabashima, K.（2021）. Prolonged high-intensity exercise induces fluctuating immune responses to herpes simplex virus infection via glucocorticoids. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 148: 1575-1588.e7.

Bilal, M., Nawaz, A., Kado, T., Aslam, M. R., Igarashi, Y., Nishimura, A., Watanabe, Y., Kuwano, T., Liu, J., Miwa, H., Era, T., Ikuta, K., Imura, J., Yagi, K., Nakagawa, T., Fujisaka, S., and Tobe, K.（2021）. Fate

of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. **Mol. Metab.**, 54: 101328.

Ikuta, K., Hara, T., Abe, S., Asahi, T., Takami, D., and Cui, G.（2021）. The roles of IL-7 and IL-15 in niches for lymphocyte progenitors and immune cells in lymphoid organs. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 434: 83-101. In "Bone marrow niche". Nagasawa, T. ed.

Takeuchi, A., Ozawa, M., Cui, G., Ikuta, K., and Katakai, T.（2021）. Lymph node stromal cells: diverse meshwork structures weave functionally subdivided niches. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** 434: 103-121. In "Bone marrow niche". Nagasawa, T. ed.

Ullrich, L., Lueder, Y., Juergens, A.-L., Wilharm, A., Barros-Martins, J., Bubke, A., Demera, A., Ikuta, K., Patzer, G. E., Janssen, A., Sandrock, I., Prinz, I., and Rampoldi, F.（2021）. IL-4 producing V$\gamma1^+$/V$\delta6^+$ $\gamma\delta$ T cells sustain germinal center reactions in Peyer's patches of mice. **Front. Immunol.**, 12: 729607.

崔広為、谷一靖江、生田宏一（2021）. T リンパ球の分化と機能における IL-7 受容体シグナルの役割 **生化学** *93*, 815-818.

List of Presentations

旭拓真、阿部真也、崔広為、榛葉旭恒、生田宏一 胎児肝臓に由来する 1 型自然リンパ球の同定 Kyoto T Cell Conference 第 30 回学術集会、オンライン、2021 年 10 月 8 日

榛葉旭恒、生田宏一 ストレスはグルココルチコイドを介して Th17 細胞の分化を促進し腸炎を増悪させる　Kyoto T Cell Conference 第 30 回学術集会、オンライン、2021 年 10 月 9 日

生田宏一、榛葉旭恒、江島亜希 ステロイドホルモンによる免疫機能とアレルギーの制御　日本アレルギー学会学術集会、JSA-JSI Joint Session、横浜、2021 年 10 月 8 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。ところがこの過程で、遺伝子の変異や様々な環境要因によって、しばしば高次構造形成に失敗したタンパク質が作られてしまう。小胞体に蓄積したこのようなミスフォールドタンパク質は、小胞体関連分解（ERAD）という機構によって、細胞質に引き出された後にプロテアソームによる分解を受ける。小胞体膜上に存在する HRD1–SEL1L ユビキチンリガーゼ複合体は ERAD において中心的な役割を担っており、ミスフォールドしたタンパク質を認識するとともに、細胞質への逆行輸送を担うチャネルを形成すると考えられている（Fig. 1）。私たちは、哺乳類細胞において、SEL1L は非常に不安定なタンパク質で、複合体を形成できないと速やかに細胞内分解を受けることを見いだした。プロテアソームの活性が阻害されると、SEL1L 分解中間体が細胞質に蓄積する。この分解中間体は、プロテアソームによって SEL1L タンパク質が部分的に切断されて生じたものと考えられた。一方伸長したポリグルタミン鎖をもつタンパク質は、細胞質や核などで凝集体を形成し、神経変性疾患を引き起こす。細胞質に蓄積した SEL1L タンパク質分解中間体は、このようなポリグルタミンタンパク質の凝集体形成を促進することが明らかになった（Fig. 1）。これらの結果は小胞体と細胞質でのタンパク質品質管理機構が相互に影響していることを示すものである。

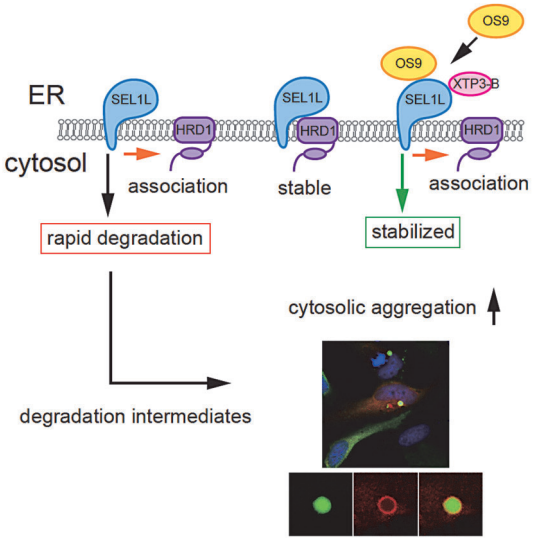


Fig. 1. Scheme of SEL1L degradation and its effect on cytosolic aggregation.

2） RNA aptamer は、その立体構造により標的の因子に特異的に結合する機能性 RNA 分子である。RNA

aptamer を用いることで、immunodepletion といった操作を行うことなく、タンパク質複合体などで機能を発揮している標的因子の機能を阻害することができる。本研究分野では、このツールを用いて、1）真核生物における転写制御機構の解析および 2）生理反応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

ショウジョウバエの Hsp70 遺伝子では、RNA ポリメラーゼが転写開始後、約 30 ～ 40 ヌクレオチドの RNA を合成した段階で、伸長を停止する反応が見られる。これは Promoter Proximal Pausing of RNA polymerase II と呼ばれ、転写開始後から本格的な伸長反応に入る前の段階にあると考えられる。ここで見られる停止複合体の成立および解除機構を調べることは、転写開始から伸長反応への移行に関わる仕組みを明らかにすることにつながると考えられる。

停止複合体の形成に関わると考えられる TBP および GAF に対する aptamer を用いた研究から、TBP のプロモーターへの結合は安定的なものではなく、このことが転写開始を促す役割を果たしている可能性があること、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おり、転写開始と伸長反応との両方に関わる因子である可能性があること、が示唆される。GAF には TAF3 といった基本転写因子が結合するだけではなく、FACT や NELF といった伸長に関わる因子も結合することが知られている。我々の取得した aptamer が GAF とこれらの因子との結合をどのように阻害しうるのかを解明することにより、真核生物の転写制御機構の解明に努めたい。

②生理反応におけるコラーゲンの機能解析

コラーゲンは生体内に最も多く含まれるタンパク質の 1 つであり、生体の構造の維持、強度の確保に関わっている。また、血液凝固など、生体内で起こる様々な生理反応における足場タンパク質としても機能していることが知られている。生理反応におけるコラーゲンの機能を解析するためのツールとして、我々は RNA aptamer の利用を考えている。これまでに 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 SELEX における標的因子として用いることにより、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。これらの RNA のペプチドに対する結合については現在解析中であるが、繊維性タンパク質に対する RNA aptamer の取得はこれまでに報告が少なく、得られた RNA がその一例となることが期待されるとともに、生理反応におけるコラーゲンの機能の解明につなげていきたい（平芳 G）。

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た（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

これまでに、V14 セグメントと D1 セグメントが 12/23 rule に反して tail-to-tail につながった V14-D1 coding joint（CJ）を正常胸腺から検出している。この構造は、D1-J 再構成の際に J coding end（CE）

と 23RSS（D1）signal end（SE）が非正統的につながる hybrid joint（HJ）がまず生じ、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。また、D1 と J2.6 の間で、D1 CE と 12RSS（J2.6）SE とがつながった HJ と、12/23 rule とは矛盾する 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）。一方で、V14 セグメントと D2 セグメントが tail-to-tail につながった構造は、検出することができなかった。そこで、D1 といずれの J 間での再構成において HJs が形成されるかを詳しく調べたところ、D1 と J2.6 の組換え時にほぼ限られることを明らかにした。

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 HJs 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、D1 と J2.6 という D、J 領域で最も離れた位置にあるセグメント間に限れば HJs が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、特定の距離にある遺伝子間の HJ 形成が関与しているのではないだろうか。

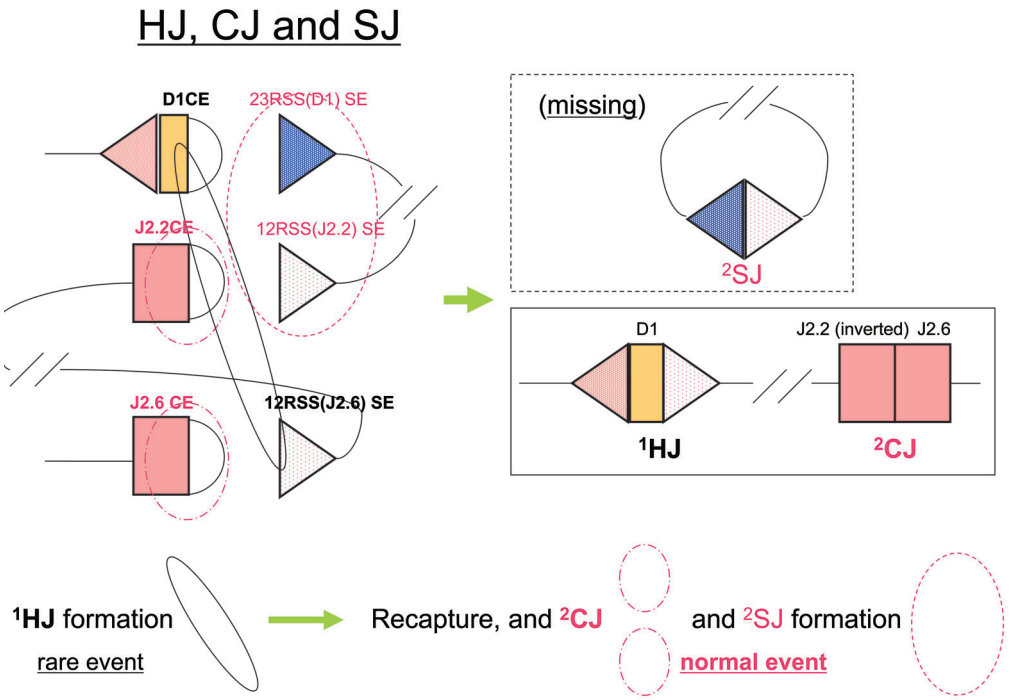


Fig. 2. An illegitimate HJ between D1 CE and 12RSS（J2.6）SE, a head-to-head CJ between J2.2 CE and J2.6 CE, and a SJ between 23RSS（D1）SE and 12RSS（J2.2）SE that is deleted from the genome.

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. During this process, protein misfolding sometimes occurs due to genetic mutations of proteins and environmental stresses. Misfolded proteins are retained in the ER（endoplasmic reticulum）, and subsequently retrotranslocated from the ER to be degraded by the cytosolic proteasomes, a mechanism named as ERAD（ER-associated protein degradation）. HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex in the ER membrane plays a central role in this process, by recognizing misfolded proteins in the ER, as well as forming a retrotlanslocon（Fig. 1）. We have reported that mammalian SEL1L protein is unstable, and rapidly degraded when it failed to form complex with HRD1. Degradation intermediates accumulated in the cytosol when proteasome function was inhibited. These intermediates were generated by the incomplete proteolysis by the proteasome. It is reported that proteins with expanded polyglutamine tracts aggregates in the cells, causing polyglutamine diseases. We found that SEL1L degradation intermediates stimulated the cytosolic aggregation of polyglutamine-expanded proteins（Fig. 1）. These results suggest that protein homeostasis in the ER and cytosol are tightly interconnected.

2）RNA aptamers are defined as RNA oligonucleotides that can specifically bind to target molecules with high affinity. These properties make RNA aptamer possible to probe the function of target molecules without such treatment as immunodepletion. Our group uses this tool 1）to investigate the eukaryotic transcriptional regulation mechanism and 2）to analyze the function of collagen molecules.

① Analysis of Transcriptional Regulation Mechanism in Eukaryotes

In the Drosophila Hsp70 gene, RNA polymerase synthesizes about 30-40 nucleotides of RNA after transcription is initiated, and then stops elongation. This is called Promoter Proximal Pausing of RNA polymerase II, and is thought to be a stable mode between transcription initiation and the transcription elongation reaction. Investigating the mechanism of formation and release of the stable complex will help elucidate the mechanism involved in the transition from transcription initiation to elongation.

Studies using aptamer against TBP and GAF, which are thought to be involved in the formation of the paused complex, have revealed that the binding of TBP to the promoter is not stable, which may play a role in promoting transcription initiation, and that GAF has two ways to control transcription: the GAGA sequence dependent regulation at PIC formation stage and GAGA sequence independent regulation at the post-initiation stage. GAF is reported to bind not only to basic transcription factors such as TAF3, but also to the elongation factors such as FACT and NELF. We would like to elucidate how our aptamers can inhibit the binding of GAF to these factors and clarify the molecular mechanisms of transcription elongation in eukaryotes.

② Functional analysis of collagen in physiological reactions

Collagen is one of the most abundant proteins in living organisms and is involved in maintaining the structure and giving strength of the organism. It is also known to function as a scaffold protein in various physiological reactions such as blood coagulation. We are considering the use of RNA aptamer as a tool to analyze the function of collagen in physiological reactions. We have so far succeeded in obtaining several RNA clones by using synthetic peptides containing α-integrin and PEDF binding sequences of type I collagen as target factors in SELEX. The binding of these RNAs to peptides is currently being analyzed, and it is promising that the obtained RNAs specifically recognize the target sequences, and act as an inhibitor for several physiological reactions. We would like to use these RNAs to analyze the function of collagen in vivo.

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. This V14-D1 coding joint（CJ）is thought to emerge 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 RAG complex recaptures V14 that is flanked with 23RSS and finally forms V14-D1 CJ. Also, we could find the alternative 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）. On the other hand, V14-D2 CJ cannot be detected. Then, we newly discovered that HJ formation almost only occurs between D1 and the most 3' situated J segment, J2.6.

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. Remarkably, our data revealed that infrequent HJs can be formed during D1-J2.6 assembly even in normal thymus. Some oncogenic DNA joinings occur seemingly against the 12/23 rule. Our data suggest that a rare HJ leads to such gene recombination.

List of Publications

Hattori T, Hanafusa K, Wada I, Hosokawa N.: SEL1L degradation intermediates stimulate cytosolic aggregation of polyglutamine-expanded protein. *FEBS J.*:**288**, 4637-4654（2021）. https://doi.org/10.1111/febs.15761

Hirata Y, Matsui Y, Wada I, Hosokawa N.: ER-to-Golgi trafficking of procollagen III via conventional vesicular and tubular carriers. Mol. Biol. Cell,（in press）. doi: 10.1091/mbc.E21-07-0372

List of Presentations

松井優人、平田幸大、和田郁夫、細川暢子：ライブイメージング法を用いたIV型コラーゲン細胞内輸送機構の解析 .（第 73 回日本細胞生物学会大会）（web 開催、口頭発表）（2021.6.29-7.2、京都市）

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

生体材料学分野
Laboratory of Biomaterials

教　授	**田畑　泰彦**	**Prof.**	**Yasuhiko Tabata**
助　教	**安藤　　満**	**Assist. Prof.**	**Mitsuru Ando**

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

1）生体組織の再生治療のための生体材料

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

2）幹細胞工学および再生・創薬研究のための生体材料

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

ついて研究開発を行っている。種々の生体材料からなる培養基材あるいは培養装置（バイオリアクタ）の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、細胞移植再生治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけではなく、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かせるための試みが行われている。これがDDSである。DDSの目的は、薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲ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

Takehana, S., Murata, Y., Jo, JI., Tabata, Y.（2021）Complexation design of cationized gelatin and molecular beacon to visualize intracellular mRNA. PLoS One. 2021 Jan 25;16（1）:e0245899. doi: 10.1371/journal.pone.0245899. eCollection 2021.PMID: 33493232

Kimura, A., Jo, JI., Yoshida, F., Hong, Z., Tabata, Y., Sumiyoshi, A., Taguchi, M., Aoki, I.（2021）Ultra-small size gelatin nanogel as a blood brain barrier impermeable contrast agent for magnetic resonance imaging. Acta Biomaterialia Volume 125, 15 April, 290-299

Campos, Y., Sola, FJ., Fuentes, Gastón., Quintanilla, L., Almirall, A., Luis J. Cruz, José C. Rodríguez-Cabello and Tabata, Y.（2021） The Effects of Crosslinking on the Rheology and Cellular Behavior of Polymer-Based 3D-Multilayered Scaffolds for Restoring Articular Cartilage. Polymers 2021, 13, 907. https://doi.org/10.3390/polym13060907

Kawaguchi, S., Soma, Y., Nakajima, Kazuaki., Kanazawa, H., Tohyama, S., Tabei, R., Hirano, A., Handa, N.,

Yamada, Y., Okuda, S., Hishikawa, S., Teratani, T., Kunita, S., Kishino, Y., Okada, M., Tanosaki, S., Someya, S., Morita, Y., Tani, H., Kawai, Y., Yamazaki, M., Ito, A., Shibata, R., Murohara, T., Tabata, Y., Kobayashi, E., Shimizu, H., Fukuda, K., Fujita, J.（2021）Intramyocardial Transplantation of Human iPS Cell–Derived Cardiac Spheroids Improves Cardiac Function in Heart Failure Animals. JACC: Basic to Translational Science Volume 6, Issue 3, March 2021, Pages 239-254

Watanabe, M., Li, H., Yamamoto, M., Horinaka, J., Tabata, Y., Flake, AW.（2021） Addition of glycerol enhances the flexibility of gelatin hydrogel sheets; application for in utero tissue engineering. J Biomed Mater Res B Appl Biomater2021 Jun;109（6）:921-931. doi: 10.1002/jbm.b.34756.

Yao-Sheng Li, Hong-Hui Wu, Xin-Chi Jiang, Tian-Yuan Zhang, Yi Zhou, Ling-Ling Huang, Pei Zhi, Yasuhiko Tabata, Jian-Qing Gao.（2021）Active stealth and self-positioning biomimetic vehicles achieved effective antitumor therapy. Journal of Controlled Release Volume 335, 10 July 2021, Pages 515-526

A.Murashima-Suginami., H. Kiso., Y. Tokita., E. Mihara., Y. Nambu., R. Uozumi., Y. Tabata., K. Bessho., J. Takagi., M. Sugai., K. Takahashi.（2021）Anti–USAG-1 therapy fortooth regeneration through enhanced BMP signaling.　Science Advances 2021feb12;7（7）:eabf1798.doi:101126/sciadv.abf1798.

Shamsul Bin Sulaiman, Shiplu Roy Chowdhury, Mohd Fauzi Bin Mh Busra, Rizal Bin Abdul Rani, Nor Hamdan Bin Mohamad Yahaya, Yasuhiko Tabata, Yosuke Hiraoka, Ruszymah Binti Haji Idrus and Ng Min Hwei（2021）Type II Collagen-Conjugated Mesenchymal Stem Cells Micromass for Articular Tissue Targeting. Biomedicines 9,880. https://doi.org/10.3390/biomedicines9080880

Mitsuyoshi Imaizumi, Ryosuke Nakamura, Yuta Nakaegawa, Bayu Tirta Dirja, Yasuhiro Tada, Akiko Tani, Takashi Sugino, Yasuhiko Tabata, Koichi Omori.（2021） Regenerative potential of basic fibroblast growth factor contained in biodegradable gelatin hydrogel microspheres applied following vocal fold injury: Early effect on tissue repair in a rabbit model. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology 2021;87（3）:274-282

Tomohiro Minakawa □ Tetsuya Matoba □ Fumiyoshi Ishidate □ Takahiro K. Fujiwara □ Sho Takehana □ Yasuhiko Tabata □ Jun K. Yamashit.（2021）Extracellular vesicles synchronize cellular phenotypes of differentiating cells. Journal of Extracellular Vesicles https://doi.org/10.1002/jev2.12147

Dewi Utami Nike, Haliza Katas, Nor Fatimah Mohd, Yosuke Hiraoka, Yasuhiko Tabata, Ruszymah Bt Hj Idrus and Mh Busra Fauzi. Characterisation of Rapid In Situ Forming Gelipin Hydrogel for Future Use in Irregular Deep Cutaneous Wound Healing. Polymers 2021, 13, 3152. https://doi.org/10.3390/polym13183152

Jun-ichiro Jo, Tsubasa Emi and Yasuhiko Tabata.（2021） Design of a Platelet-Mediated Delivery System for Drug-Incorporated Nanospheres to Enhance Anti-Tumor Therapeutic Effect. Pharmaceutics 2021, 13, 1724. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101724

Takeshi Kataoka, Yutaka Mifune, Atsuyuki Inui, Hanako Nishimoto, Takashi Kurosawa, Kohei Yamaura, Shintaro Mukohara, Takehiko Matsushita, Takahiro Niikura, Yasuhiko Tabata and Ryosuke Kuroda.（2021）Combined therapy of platelet-rich plasma and basic fbroblast growth factor using gelatin-hydrogel sheet for rotator cuf healing in rat models. J Orthop Surg Res 16:605 https://doi.org/10.1186/s13018-021-02771-

Nagai H, Nishiyama K, Seino Y, Tabata Y, Yamashita T.（2021）Effect of Fascia Implantation and Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor for Muscle Atrophy in Rat Laryngeal Paralysis. Otolaryngol Head Neck Surg. 2021 Oct 19:1945998211052895. doi: 10.1177/01945998211052895. Online ahead of print.PMID: 34665680

Maheswary Thambirajoo, Manira Maarof, Yogeswaran Lokanathan, Haliza Katas, Nur Fatiha Ghazalli, Yasuhiko Tabata and Mh Busra Fauzi.（2021）Potential of Nanoparticles Integrated with Antibacterial Properties in Preventing Biofilm and Antibiotic Resistance. Antibiotics 2021, 10, 1338. https://doi.org/10.3390/antibiotics10111338

Hiroaki Osada, Masahide Kawatou, Daiki Fujita, Yasuhiko Tabata, Jun K.Yamashita, Hidetoshi Masumoto.（2021）Therapeutic potential of clinical-grade human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissues. JTCVS Open Volume 8, Pages 359-374

Kataoka T, Mifune Y, Inui A, Nishimoto H, Kurosawa T, Yamaura K, Mukohara S, Matsushita T, Niikura T, Tabata Y, Kuroda R.（2021）Combined therapy of platelet-rich plasma and basic fibroblast growth factor using gelatin-hydrogel sheet for rotator cuff healing in rat models. J Orthop Surg Res. Oct 16;16（1）:605.

Kuwahara, Y., Yoshizaki, K., Nishida, H., Kamishina, H., Maeda, S., Takano, K., Fujita, N., Nishimura, R., Jo, J. J., Tabata, Y., Akiyoshi, H.（2021）. Extracellular Vesicles Derived from Canine Mesenchymal Stromal Cells in Serum Free Culture Medium Have Anti-inflammatory Effect on Microglial Cells. **Front. Vet. Sci.** 8, 633426.

Saotome, T., Shimada, N., Matsuno, K., Nakamura, K., and Tabata, Y.（2021）. Gelatin hydrogel nonwoven fabrics of a cell culture scaffold to formulate 3-dimensional cell constructs. **Regen. Ther.** 18, 418-429

BS Shamsul, SR Chowdhury, MB Fauzi, R Abdul Rani, NHM Yahaya, Y Tabata, Y Hiraoka, BHI Ruszymah and MH Ng（2021）. 3D Culture of MSCs on a Gelatin Microsphere in a Dynamic Culture System Enhances Chondrogenesis. 21（8）, 1-17

Mishima S, Takahashi K, Kiso H, Murashima-Suginami A, Tokita Y, Jo J, Uozumi R, Nambu Y, Huang B, Harada H, Komori T, Sugai M, Tabata Y, Bessho K.（2021）Local application of USAG-1 siRNA has potential to regenerate teeth in Runx2-deficient mice, **Sci Rep**, 11, 13674

Osada, H., Kawatou, M., Fujita, D., Tabata, Y., Minatoya, K., Yamashita, J.K., Masumoto, H.（2021）. Therapeutic potential of clinical-grade human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissues.

JTCVS Open. 8, 359-374

List of Presentations

海外での招待講演

Tabata, Y. Drug Delivery Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Advances in Tissue Engineering 28th Annual Short Course. Houston, USA. Online August.11-14, 2021

Kataoka T, Mifune Y, Inui A, Nishimoto H, Kurosawa T, Yamaura K, Mukohara Yoshikawa T, Shinohara I, Kato T, Furukawa T, Tabata Y, Kuroda R. THE COMBINED THERAPY OF PRP AND BASIC FGF USING GELATIN HYDROGEL SHEET FOR ROTATOR CUFF HEALING IN RAT MODEL ISSCR/JSRM 2021 virtual Tokyo International Symposium, Tokyo, October 27-29, 2021

Kanda, Y., Kakutani, K., Yurube, T., Zhang, Z., Kakiuchi, Y., Takeoka, Y., Tsujimoto, R., Miyazaki, K., Ohnishi, H., Matsuo, T., Ryu, M., Takada, T., Tabata, Y., Kuroda, R. Topical application of gelatin hydrogel microspheres incorporating cisplatin for bone metastasis enhanced anti-tumor effects with less side effects. International Society for Stem Cell Research International Symposium Tokyo 2021, Tokyo, October 27-29, 2021

Takafuji, Y., Kawao, N., Mizukami, Y., Okada, K., Jo, J., Tabata, Y., Kaji H. Transplantation of combined muscle cell-derived extracellular vesicles and gelatin hydrogel improves bone repair delayed in diabetic mice. The International Society for Stem Cell Research 2021 Tokyo Symposium, Tokyo, October 27-29, 2021

Kajihara, R., Kawabata, S., Tabata, Y. Application of silk-elastin as injectable hydrogel for cell transplantation. ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium, Tokyo, October 27-29, 2021

Matsuno, K., Saotome, T., Shimada, N., Nakamura, K., and Tabata, Y. Potential of Gelatin hydrogel nonwoven fabric Genocel® as a 3D cell culture scaffold. SSCR/JSRM 2021 virtual Tokyo International Symposium, Online, October 27-29, 2021

Matsuno, K., Nakamura, K., Saotome, T., Shimada, N., Nobutani K., and Tabata Y. Tissue engineering applications of gelatin hydrogel nonwoven fabrics Genocel®. SSCR/JSRM 2021 virtual Tokyo International Symposium, Online, October 27-29, 2021

Mh Busra Fauzi, Yasuhiko Tabata.Insight of Multifunctional Natural-based Biomaterials Strategies for Skin Tissue Engineering: Current Update. AFOBMCIS 2021, "Biotechnology towards Sustainable Development Goals（SDGs）and Circular Bioeconomy," Virtual Platform, September22-23, 2021

Mh Busra Fauzi, Yasuhiko Tabata.（2021）Current Update On Natural-Based Functional Biomaterials For Skin Tissue Engineering. ROYAN 1st TESMA International Joint Webinar on Tissue Engineering & Regenerative Medicine, Virtual Platform, April26, 2021

Mh Busra Fauzi, Yasuhiko Tabata.Natural-Based Biomaterials For Skin Tissue Engineering. TERMIS Virtual Seminar Series, hosted by TERMIS SYIS AM, EU, and AP. Virtual Platform, May25, 2021

Mh Busra Fauzi, Yasuhiko Tabata, Ruszymah Idrus.Ovine Collagen Type I a Potential Medical Device for Rapid Treatment of Wound Management: The Possible Challenges and Obstacles in Malaysia. TERMIS-WC2021, Maastrich, The Netherlands, Hybrid Platform, November15-19, 2021

Mh Busra Fauzi, Yasuhiko Tabata. Multifunctional-Natural Biomaterials in Wound Healing for Skin Tissue Engineering Applications. 43rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials and the 8th Asian Biomaterials Congress（43JSB & 8ABMC）, Nagoya, Japan, Virtual Platform, November 28-30, 2021

Yasuhiko Tabata, Mh Busra Fauzi. Dual-Layer Hybrid Biomatrix Incorporated with Elastin for Diabetic Ulcer. APASTB 2021, Virtual Platform, March19-21, 2021

Yasuhiko Tabata, Mh Busra Fauzi. A comparative study of hybrid gelatin- and honey-collagen biomatrix in dual microenvironments for skin wound healing. APASTB 2021, Virtual Platform, March19-21, 2021

Syafira, Yasuhiko Tabata, Mh Busra Fauzi. Hybrid Gelatin-Pva Bioinks For Chronic Wound Healing By Using 3d-Bioprinting. AFOBMCIS 2021, "Biotechnology towards Sustainable Development Goals（SDGs）and Circular Bioeconomy," September22-23, 2021

Zawani, Yasuhiko Tabata, Mh Busra Fauzi. The Effect Of Injectable Hybrid Gelastin Hydrogel For Wound Healing: Epigallocatechin Gallate. AFOBMCIS 2021, "Biotechnology towards Sustainable Development Goals（SDGs）and Circular Bioeconomy," Virtual Platform, September22-23, 2021

Shamsul Sulaiman, Mohd Fauzi Mh Busra, Ng Min Hwei, Rizal Abdul Rani, Nor Hamdan Mohamad Yahaya, Yasuhiko Tabata, Ruszymah Idrus, Shiplu Roy Chowdhury.

A Culture Model of Human Osteoarthritis Osteochondral Organs for Cartilage Tissue Engineering. Postgraduate Research Symposium 2021（TERMSYMPO 2021）TERMSYMPO UKM, Malaysia. Virtual Platform, July28, 2021

Miura, Y., Tabata, Y., Sakurai, H. IDENTIFICATION OF NEW POLYMAER MIXTURE TO ENHANCE THE ENGFARTMENT EFFICIENCY OF HUMAN IPS CELL-DERIVED MUSCLE STEM CELL IN THE DIAPHRAGM OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY MODEL MICE. ISSCR/JSRM International Symposium Virtual. October 27-29, 2021.

Takahashi, K., Murashima-Suginami, A., Kiso, H., Tokita, Y., Sugai, M., Takagi, J., Bessho, K., Tabata, Y. Development of tooth regenerative medicine strategies by controlling the number of teeth using targeted molecular therapy. International Society For Stem Cell Research TOKYO 2021 SYNPOSIUM

国内でのシンポジウム招待講演

田畑泰彦　再生医療におけるバイオマテリアル技術と事業化．再生医療 DDS セミナー、オンライン、2021 年 2 月 22 日

田畑泰彦　再生医療のための細胞力 UP バイオマテリアル技術の最前線．第 7 回再生医療 EXPO ＜大阪＞、大阪、2021 年 2 月 25 日

田畑泰彦　バイオマテリアルを利用した再生医療の最前線と今後　- 細胞能力を高める医療の実現 -．バイオマテリアルを利用した再生医療の最前線と今後の動向／事業化の方向性＜大阪開催＞、大阪、2021 年 3 月 1 日

田畑泰彦　ハイドロゲル技術が切り拓く再生医療の世界．第 20 回日本再生医療学会総会、神戸、講演は WEB 形式、2021 年 3 月 11 日

田畑泰彦　ますます拡がるライフサイエンスバイオマテリアルとしてのゼラチンの可能性．2021 ライフサイエンスバイオマテリアル研究会、WEB 形式、2021 年 9 月 22 日

田畑泰彦　細胞機能から見た再生医療モノつくりイノベーションとは．第 1 回ライブセッション in 再生医療～細胞機能を高めるモノつくり戦略～、WEB 形式、2021 年 9 月 24 日

田畑泰彦　再生医療を具現化するバイオマテリアル技術の広がりと事業化～再生医療業界の最新動向と開発課題を踏まえ～．「再生医療：バイオマテリアル」セミナー、WEB 形式、2021 年 10 月 20 日

田畑泰彦　Biomaterial Technology to Activate Cell Ability for Regenerative Therapy and Research.　再生治療と再生研究のための細胞能力を活性化するバイオマテリアル技術．第 43 回日本バイオマテリアル学会・第 8 回アジアバイオマテリアル学会、ハイブリッド形式、2021 年 11 月 28―30 日

田畑泰彦　再生医療の実現に必要なもの～細胞能力を高める技術･方法論～ . 第 46 回長崎障害者支援再生医療研究会、オンライン開催、2021 年 12 月 9 日

田畑泰彦　対象が細胞まで広がったバイオテクノロジー分野がおもしろい～細胞バイオテクノロジーの最前線に必要なものは？～．「ウエルネスシンポジウム～再生医療を細胞バイオテクノロジー + DX という観点で見てみると～」、ハイブリッド形式（京都、WEB）、2021 年、12 月 14 日

国内での一般演題

田畑泰彦　Biomaterials Indispensable for Advanced Medical Therapy.　最先端医療を支えるバイオマテリアル．神戸大学大学院講義　先端医学トピックス、神戸、2021 年 1 月 15 日

田畑泰彦　体を治す高分子．高分子化学序論、 WEB、 2021 年 7 月 14 日

田畑泰彦　バイオマテリアルを用いた再生医療．大阪大学歯学部 3 年生　歯科理工学特別講義、オ

ンライン、2021 年 9 月 29 日

田畑泰彦　Front Line of Regenerative Medicine from the Viewpoint of Biomaterials Technology. 神戸大学大学院先端医学シリーズ（英語講義）2021 年度後期、神戸、2021 年 10 月 6 日

田畑泰彦　高分子ナノ粒子／血小板ハイブリッド ドラッグデリバリーシステムの構築 .　日本化学繊維研究所 2021 年度講演会、京都、2021 年 11 月 12 日

水川皓介、南景子、片岡誠、高木敏英、田中雅幸、田畑泰彦、新居輝樹、菱川慶裕、山下伸二 舌下適用型製剤によるペプチド医薬品の新たな投与法の開発：デスモプレシン舌下ゼリー剤　日本薬剤学会第 36 年会、オンライン、2021 年 5 月 13-15 日

南景子、片岡誠、高木敏英、田中雅幸、田畑泰彦、新居輝樹、菱川慶裕、山下伸二 ペプチド医薬品の新規投与システムの開発：舌下適用型ゼリー剤　第 37 回日本 DDS 学会年会、オンライン、2021 年 6 月 29-30 日

金井 哲史、稲垣 明子、中村 保宏、猪村 武弘、Ibrahim Fathi、三頭 啓明、斎藤 竜助、宮城 重人、亀井 尚、海野 倫明、田畑 泰彦、後藤 昌史　不織布構造ゼラチン基材の導入による経門脈移植を凌駕する革新的皮下膵島移植法の確立　第 48 回日本膵膵島移植研究会、名古屋、2021 年 3 月 11-13 日

藤本洋平、古田瑛理、駒田行哉、杉浦喜久弥、田畑泰彦　低分子ヒアルロン酸溶液を用いた凍結融解後のネコ脂肪由来間葉系幹細胞の生存率の評価　第 43 回日本バイオマテリアル学会大会、名古屋、2021 年 11 月 29 日

堀下駿太、新居輝樹、田畑泰彦　TGF- β 1 含浸ゼラチンハイドロゲル粒子を組み込んだ 3 次元線維芽細胞凝集体の調製　第 67 回高分子研究発表会、神戸、2021 年 7 月 9 日

堀下駿太、新居輝樹、田畑泰彦　TGF- β 1 含浸ゼラチンハイドロゲル粒子を組み込んだ 3 次元線維化モデルの作製　第 43 回日本バイオマテリアル学会大会　第 8 回アジアバイオマテリアル学会、名古屋、2021 年 11 月 28-30 日

竹花祥、田畑泰彦 モレキュラービーコン - カチオン化ゼラチンナノ粒子を用いたオートファジーのイメージング　第 43 回日本バイオマテリアル学会大会、名古屋、2021 年 11 月 28-30 日

井上侑香、中村耕一郎、田畑泰彦 硬さの異なる均質なフィブリンハイドロゲルの調製　第 43 回日本バイオマテリアル学会大会、名古屋、2021 年 11 月 28-30 日

松野久美子、早乙女俊樹、中村耕一郎、島田直樹、田畑泰彦　3 次元細胞培養足場材としてのゼラチンハイドロゲル不織布（Genocel）の有用性 第 11 回 DDS 再生医療研究会 / 第 13 回多血小板血漿（PRP）療法研究会、オンライン、2021 年 11 月 13 日

古根川靖、升本英利、湊谷謙司、田畑泰彦 ピオグリタゾン PLGA 粒子によるマクロファージサブタイプ調節を介した心筋アポトーシスの抑制効果の検討　第 1 回比叡山 WEB ワークショップ、ウェブ、2021 年 12 月 4 日

杉並亜希子、喜早ほのか、三原恵美子、時田義人、田畑泰彦、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 20 回　日本再生医療学会総会、Web 開催（神戸）、2021 年 3 月 11-13 日

杉並亜希子，喜早ほのか、時田義人、三原恵美子、田畑泰彦、別所和久、高木淳一、菅井学、高橋克 : 歯の再生治療薬としての USAG-1 中和抗体の開発、第 42 回　日本炎症・再生医学会、Web 開催（東京）、2021 年 7 月 7-8 日

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

再生免疫学分野
Laboratory of Immunology

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

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

一方、再生したT細胞を用いた免疫細胞療法の開発も進めている。2019年はAMEDの支援を受け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-2021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）。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;2014年出願、2020年論文発表）。TCR-iPS細胞法はさらにその後発展させ、カセットテープのようにTCR遺伝子を挿入できる方法を開発した（TCRカセット法；2018年出願、TCRカクテル法;2020年出願）。

一方で免疫学的に拒絶されにくい方法の開発も進めてきた。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）。ただしこの方法では、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。2020 年に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。例えば日本人に多い 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、共同研究者である大阪大学及び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。すでに 6 種類の HLA-A2402 拘束性 TCR のクローニングを終えている。臨床試験に向けた細胞の製造は藤田医科大学で行う。

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, applied for patent in 2014）. 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). We further developed two methods by which we can easily and safely insert exogenous TCR gene into ES/iPS cells（TCR cassette method; applied for patent in 2018, TCR cocktail method; applied for patent in 2020).

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. Candidate TCR genes has been cloned in Osaka University and Fujita laboratory, and then selection of the best one from these candidates will be done in Kyoto laboratory. We have already cloned a total of six TCR genes restricted to HLA-A2402. Cell production for clinical trial will be conducted in Fujita Health University.

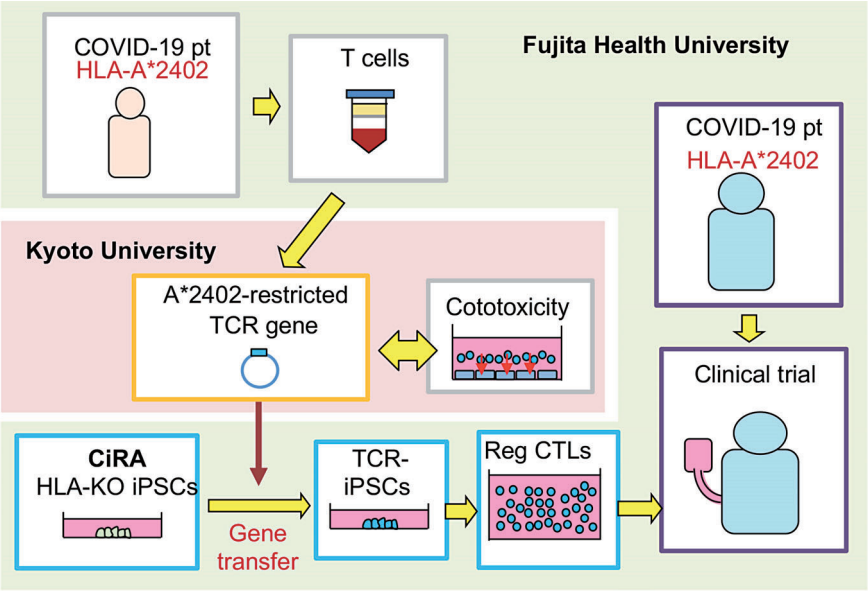


Figure 1 Development of off-the-shelf T cells to be used for the treatment of COVID-19

Candidate TCR genes, restricted to HLA-A2402, will be cloned by collaborators (Osaka University and 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 ES/iPS cells, from which the regenerated T cells will be produced. Cell production for clinical trial will be conducted in Fujita Health University.

List of Publications

Miyazaki, K., and Miyazaki, M.(2021). The Interplay Between Chromatin Architecture and Lineage-Specific Transcription Factors and the Regulation of Rag Gene Expression. **Frontiers in Immunology.** *12*: 659761.

Yoshikawa G, Miyazaki K, Ogata H, Miyazaki M. (2021). The Evolution of Rag Gene Enhancers and Transcription Factor E and Id proteins in the Adaptive Immune System. **International Journal of Molecular Sciences.** *22* (*11*):5888.

Terada K, Kondo K, Ishigaki H, Nagashima A, Satooka H, Nagano S, Masuda K, Kawamura T, Hirata T, Ogasawara K, Itoh Y, Kawamoto H, Agata Y.(2021). Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating and circulating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model. **Mol Ther Oncolytics.** *24*: 77-86.

Masuda, K., and Kawamoto, H. (2021). Possible NK cell-mediated immune responses against iPSC-derived cells in allogeneic transplantation settings. **Inflamm Regen.** *41* (*1*): 2.

Kawamoto, H., Masuda, K., and Nagano, S. (2021). Regeneration of antigen-specific T cells by using induced pluripotent stem cell (iPSC) technology. **Int Immunol.** *33* (*12*), 827-833.

増田喬子（2021）. 再生医療と移植免疫－ iPS 細胞由来再生細胞を他家移植で用いたときに起こりうる免疫反応　**医学のあゆみ**　*276*（8）, 809-817.

河本宏、増田喬子（2021）. 再生医療と免疫：iPS 細胞由来「他家」再生細胞に起こりうる免疫反応　**再生医療**　*20*（*1*）, 16-32.

河本宏、増田喬子、永野誠治（2021）. 汎用性即納型 T 細胞製剤を用いたがん免疫細胞療法の開発　**腫瘍内科**　*27*（*5*）, 570-578.

長畑洋佑、増田喬子、河本宏（2021）. 血液細胞の起源とミエロイド細胞　**臨床血液**　*62*（*5*）, 512-520.

増田喬子、河本宏（2021）. iPS 細胞からの血球細胞分化誘導とフローサイトメトリー解析　**実験医学別冊 新世代フローサイトメトリー活用スタンダード** 141-157.

List of Presentation

Kawamoto, H. Regeneration of cytotoxic T lymphocytes from iPS cells: Development of “off-the-shelf T cells” for cell therapy targeting cancer and viral infection. The 26th Congress of Asia Pacific of Blood and Marrow Transplantation. Virtual Conference, October 15-17, 2021.

Kawamoto, H. Regeneration of cytotoxic T lymphocytes from iPS cells: Development of “off-the-shelf T cells” for cell therapy targeting cancer and viral infection. 27th East Asia Joint Symposium. Virtual Conference, October 27-29, 2021.

河本宏　即納型再生キラー T 細胞を用いたがん免疫療法の開発　第 2 回東京理科大学総合研究院合成生物学研究部門シンポジウム、Web、2021 年 2 月 19 日

河本宏　即納型再生 T 細胞製剤を用いたがんおよびウイルス感染症の治療法の開発　第 100 回山口県臨床細胞学会学術集会、Web、2021 年 3 月 7 日

河本宏　iPS 細胞に安全かつ簡便に TCR 遺伝子を導入する方法：TCR カセット法の開発　第 20 回日本再生医療学会総会、Web、2021 年 3 月 11 日 -5 月 31 日

河本宏　他家再生細胞を用いた時に起こりうる免疫反応とその頻度の予測　第 20 回日本再生医療学会総会、Web、2021 年 3 月 11 日 -5 月 31 日

河本宏　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発 - 急性骨髄性白血病を対象とした臨床試験に向けて　第 20 回日本再生医療学会総会、Web、2021 年 3 月 11 日 -5 月 31 日

増田喬子　iPS 細胞由来再生細胞を他家移植で用いたときに起こりうる免疫反応とその制御法の開発　第 20 回日本再生医療学会総会、Web、2021 年 3 月 11 日 -5 月 31 日

上堀淳二　iPS 由来樹状細胞を活用したアロ抗原特異的ヒト制御性 T 細胞の増幅技術の開発　第 20 回日本再生医療学会総会、Web、2021 年 3 月 11 日 -5 月 31 日

河本宏　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発－臨床試験に向けた開発と次世代型を目指した改良－　第 85 回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、Web、2021 年 5 月 21-22 日

河本宏　iPS 細胞を材料とした汎用性即納型 T 細胞製剤による白血病治療法の開発　第 18 回日本免疫治療学会学術集会、Web、2021 年 5 月 23 日

河本宏　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発－急性骨髄性白血病を対象とした臨床試験に向けて－　第 30 回日本癌病態治療研究会、Web、2021 年 6 月 11 日

河本宏、増田喬子、永野誠治　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発－急性骨髄性白血病を対象とした臨床試験に向けて　第 13 回日本血液疾患免疫療法学会学術集会、東京・Web、2021 年 6 月 18-19 日

河本宏、増田喬子、永野誠治　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発－急性骨髄性白血病を対象とした臨床試験に向けて－　第 42 回日本炎症・再生医学会、Web、2021 年 7 月 7-8 日

渡邊武、小林由佳　免疫誘導能を持つヒト末梢リンパ組織の人工的構築　第 42 回日本炎症・再生医学会、Web、2021 年 7 月 7-8 日

河本宏　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発 - 急性骨髄性白血病を対象とした臨床試験に向けて -　第 29 回日本組織適合性学会大会、Web、2021 年 9 月 3-5 日

増田喬子　iPS 細胞由来再生細胞を他家移植で用いたときに起こりうる免疫反応とその制御法の開発　第 29 回日本組織適合性学会大会、Web、2021 年 9 月 3-5 日

河本宏　免疫学の基礎と最前線 : 自己免疫疾患 - がん免疫療法から新型コロナ感染症まで -　第 30 回日本小児リウマチ学会学術集会、東京・Web、2021 年 10 月 15-17 日

河本宏　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発 - がん免疫療法およびウイルス感染症治療への応用 -　第 39 回日本ヒト細胞学会学術集会、Web、2021 年 10 月 30-31 日

Miyazaki, M. E2A specifies adaptive immunity by instructing large-scale topological changes for Rag gene super-enhancer formation. The 94th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Virtual event. November 3-5, 2021.

河本宏　iPS 細胞から作製した T 細胞製剤：がんおよびウイルス感染症への応用　第 32 回日本消化器癌発生学会総会、Web、2021 年 11 月 26-27 日

河本宏　iPS 細胞を材料とした即納型汎用性 T 細胞製剤の開発－がんおよびウイルス感染症への応用－　第 34 回バイオセラピィ学会学術集会総会、和歌山、2021 年 12 月 16-17 日

Nagahata, Y., Masuda, K., Ikawa, Tomokatsu., Kitawaki, T., Satou, Y., Takaori-Kondo, A., and Kawamoto, H. Emergence and divergence of blood cells in evolution by ‘On’ and ‘Off’ of CEBPa. 第 83 回日本血液学会学術集会、Web、2021 年 9 月 23-25 日

永野誠治、寺田晃士、縣　保年、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 30 回 Kyoto T Cell Conference、Web、2021 年 10 月 8-9 日

長畑洋佑、増田喬子、伊川友活、高折晃史、河本宏　血液細胞の起源　第 30 回 Kyoto T Cell Conference、Web、2021 年 10 月 8-9 日

Miyazaki, M., Kawamoto, H., and Miyazaki, K. Conserved two E-box sequences neighboring the Rag1-promoter is critically required for the initiation of Rag1 gene expression upon T and B cell lineage commitment; Distinct gene regulation mediated by enhancers and promoter for adaptive immunity. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Nara, Japan, December 8-10, 2021

Miyazaki, K., Kawamoto, H., and Miyazaki, M. The Synergic Role of E2A and Notch signaling in T cell lineage-specific enhancer regulome. The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Nara, Japan, December 8-10, 2021

Nagano, S., Masuda, K., and Kawamoto, H. Regeneration of CTLs derived from CAR-iPSCs on stimulation through CAR signal. 第 50 回日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日

Nagahata, Y., Masuda, K., Ikawa, T., and Kawamoto, H. Emergence and divergence of blood cells in evolution by ‘On’ and ‘Off’ of CEBPa. 第 50 回日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日

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

再生増殖制御学分野（再生免疫学分野内）
Department of Growth Regulation（in Lab of Immunology）

連携教授（名誉教授） 瀬原　淳子　　Coop. Prof.　　Atsuko Sehara

地球上の全ての生物が共有する主たる環境因子の一つが ”重力” である。動物も植物も、重力に抗して成長し、老衰すると動物は立てなくなり植物は萎れる。このように、重力は私たち人間のみならず全ての生物が事実上終生その影響下にあるにも関わらず、それに関する科学的知見は乏しい。その理由は、重力の影響を長期的に除去することは地球上では不可能であり、現時点では地球を離れ、宇宙空間へ飛び出すしか方法がないからだ。20 年余り前に本研究所に赴任した瀬原は、約 15 年前、新たな研究課題としてこの抗重力の仕組みの解明を決断した。

抗重力機構の解明へ

旧称　再生医科学研究所において「再生増殖制御学分野」を担ってきた瀬原研究室は、発生・再生過程における細胞間相互作用とその制御機構を中心とする研究を行ってきた。増殖因子シグナリングや接着制御に関わる ADAM プロテアーゼに関する研究を中心に、ユニークな研究を行ってきたと言えよう。特に、骨格筋は骨格筋組織内に局在する幹細胞により再生する臓器であると同時に、腱を介して骨と連結され、神経支配を受けて運動に関わることから、筋再生機構やそれらの筋腱接合部、神経筋接合部形成の仕組みの解明にも取り組んできた。一方、この臓器は運動による維持、すなわち筋収縮に対する負荷応答が必要なユニークな臓器でもあり、その仕組みの解明は、高齢社会において社会的にも極めて重要であるが、その課題に対する世界的な研究動向の中で、我々がその課題にどう向き合うべきか、その方針の決断は長年の懸案事項だった。運動できないと萎縮が起こるという、プロテアーゼを介することが知られる廃用性筋萎縮は、確かに重要な研究対象であるが、注目すべき高齢者の筋萎縮はその仕組みだけでは説明できないのではないか、というのが根底にある問題意識であった。骨折や寝たきりになっても、若者ではまたすぐに回復するのに、高齢者では回復に長い時間を要し、時には回復不可能となるが、その原因・分子機構はほとんど不明なままである。瀬原は、その要因の一つが、未解明な抗重力という生命の本質に備わる能力ではないか、と考えた。

そう考えたきっかけは、宇宙滞在に伴う筋萎縮であった。今は半ば常識になっているが、重力負荷もまた骨格筋維持の重要な要因であることは、実は 1970 年ソユーズ 9 号で 18 日間宇宙に滞在した宇宙飛行士に著しい筋力低下と筋萎縮が見られたことなどから、初めて示唆されたものであった。骨格筋活動量低下によって引き起こされる筋萎縮は、上記のように廃用性筋萎縮と呼ばれ、運動再開によって回復する。宇宙滞在に起因する筋萎縮も、この廃用性筋萎縮に類似すると考えられてきた。これは、ISS 内での運動負荷による筋萎縮の顕著な軽減や、地球帰還後のリハビリテーショ

ンによる回復などが根拠となっている。しかし、宇宙滞在による筋萎縮は、どこまで可塑的な廃用性筋萎縮と共通性があり、また異なるのだろうか？　私たちのひとつの疑問はそこにあった。現在、筋萎縮予防策として宇宙飛行士はISSにおいて毎日2時間程度の運動を行う必要があるが、そのように運動していても、長期宇宙滞在は15%前後の筋量減少とそれに伴う筋力低下や代謝の変化をもたらす。そして、ミオシン重鎖で区別される筋繊維のタイプが、I型のミオシン重鎖を持つ遅筋タイプから、I/IIa型、IIa型を持つ速筋タイプへと変化することがヒトで確認されており、これは長期寝たきりによる変化に類似するものであるとされ、重力負荷と運動負荷が関わる骨格筋維持の仕組みの違いを反映していると考えられる。さらに、宇宙滞在が血液循環や神経系に影響を及ぼすことも明らかになってきた今、神経支配を受け、血管に囲まれた骨格筋の変化は、それらの機能変化と密接に関わっている可能性がある。骨格筋はグルココルチコイドなどのストレスホルモンの影響を受けやすい臓器でもある。生体リズムが乱れ、極限的閉鎖ストレスに晒される宇宙環境は、骨格筋にも大きな影響を与えうる。宇宙放射線の影響、とりわけ幹細胞への影響なども加味する必要があるかも知れない。加齢・癌などの疾病に伴う不可逆性のある筋萎縮についての知見が乏しいのと同様、宇宙での筋萎縮メカニズムは未知なところが多いのである。今後の有人火星探査などでは、これまで人類が経験をしたことのない超長期宇宙滞在が想定されることからも、その解明は喫緊の課題と言えよう。

ゼブラフィッシュの宇宙滞在効果を調べる

このように、重力が生命に及ぼす本質についての根源的な疑問と同時に、社会的に解決を必要とする課題への一つの鍵としての抗重力機構に着目し、私たちはついに宇宙実験を遂行、抗重力の仕組みの解明を目指した。現在、地球の重力圏を離れ長期的に微重力環境に滞在することが可能なのは唯一、国際宇宙ステーション（ISS）だけである。ISSには日本実験棟「きぼう」があり、そこでは宇宙環境を対象とした様々な研究が実施されている。生物実験としては、微重力環境だけではなく、宇宙放射線曝露環境や長期閉鎖環境などの極限環境やその複合的ストレス環境を対象として実施されている。私たちの研究グループは宇宙滞在による骨格筋萎縮メカニズムの解明を目的として、小型魚類であるゼブラフィッシュを用いた2度のISS宇宙滞在実験（*Zebrafish Muscle*, *Zebrafish Muscle 2*）を実施した。これら2回の宇宙実験は、JAXAの皆様の協力を得て、そのほとんど全てを助教であった佐藤文規が行った。関連する地上実験も、宇宙・地上実験のデータ解析についても佐藤が中心となって行ってきたが、生命科学研究科の学生だった森川俊や、理化学研究所松崎グループ、呉泉らの協力も欠かせないものであった。また、RNA解析は、「先進ゲノム支援」を受け、東大・鈴木穣グループの多大なサポートにより行なわれた。

宇宙滞在による筋萎縮について、廃用性筋萎縮との類似性や差異を検討する上で、運動量を評価する必要がある。陸生動物モデルを宇宙実験で使う場合は、歩行が困難なため、その運動量減少に起因する廃用性萎縮を考慮せねばならない。宇宙滞在に伴うゼブラフィッシュの運動量の変化とともに、その経時経過を調べることにより、彼らが微重力環境にどのように適応していくのかを調べることができた。多くの魚には光に背を向けて泳ぐ背光性がある。宇宙滞在実験ではこの性質を利用し、安定した飼育を可能としている。平衡感覚は基本的に前庭器官がその役割を担うが、微重力

環境下では前庭器官が機能しなくなるため、魚類は視覚情報を頼りに上下を認識するようになる。そのため、ISS 内では水槽上方に LED 照明を設置し、さらに水槽下方から給餌を行うことによって暫定的な上下を設定している。ISS・地上コントロール飼育とも定期的に動画を撮影し、これを用いて運動距離・速度を測定、運動の量と質を評価した。その結果、ゼブラフィッシュは無重力に対し非常に高い適応能力を示し、ISS 滞在数日後には地上コントロールと区別がつかなくなるほど上手に泳ぐ様子が確認された。驚いたことに、地上コントロールに比較して、運動量には変化がないことが明らかとなった。ゼブラフィッシュを用いた宇宙滞在実験の優位性の一つとして、廃用性萎縮の影響が陸生動物より格段に小さいことが確認できたのである。

当初から狙っていたもう一つの優位性は、ゼブラフィッシュが小さな脊椎動物である、ということであった。ISS では、無重力であるため、オープンスペースでの動物の解剖ができない。そのため、マウスなどの実験では、地上への帰還後、それらを解剖して解析に供する必要があった。しかし、本当に抗重力効果を見ようとするなら、宇宙滞在中に検体を解析する、それができないなら宇宙で検体を作成する必要がある。宇宙滞在させたゼブラフィッシュは体長 2cm 弱の 6 週齢で、遺伝子発現解析のため、解剖することなく個体ごと固定することができた。宇宙飛行士さんに実験をお願いせねばならない、貴重な宇宙実験であることから、なるべく網羅的に失敗なくデータを収集するために、トランスクリプトームにより宇宙滞在中の遺伝子発現の変化を調べ、それを地上コントロールと比較することで、真に宇宙で何が起こっているかを明らかにしようとしたのである。また、地上に帰還後 2 日目のデータもとって比較したところ、宇宙滞在中と帰還後ではその遺伝子発現は大幅に変化していることがわかり、宇宙で顕著に上昇し帰還後 2 日目には逆に減少しているような遺伝子も数多く同定できた。

現在、無重力により変化する遺伝子とそのネットワークについて解析し、我々の筋肉が、どのような抗重力遺伝子群により支えられているのか、論文執筆中である。その報告を今しばらくお待ち願いたい。

When we immobilize a broken bone in a cast or need to be on extended bed rest, we experience a rapid decrease in the mass and strength of skeletal muscle. This type of muscle wasting, called as disuse muscle atrophy, is reversed in daily life, and promoted by exercise. In contrast, gradual and generalized loss of skeletal muscle mass and function in sarcopenia, a age-related syndrome, and in disease-related cachexia seriously affects quality of life because it is irreversible to date unfortunately. The severe muscle atrophy is also caused by neurogenic diseases such as amyotrophic lateral sclerosis and spinal cord injury because the command center or the neural circuit of exercise is affected in these cases.

Our group, mainly Dr. Fuminori Sato, has addressed a key question how skeletal muscle atrophy occurs under microgravity using adult zebrafish, tropical fresh water fish. We appreciate JAXA's continuous supports on our project named "Zebrafish Muscle" and complete execution of the experiments in ISS by astronauts. We also appreciate wonderful collaborations with Fumio Matsuzaki's group in Kobe Riken and Yutaka Suzuki's group in the University of Tokyo. All the obtained transcriptome data will delineate

progression and mechanisms of muscle atrophy in space. Especially, we would like to elucidate progression of muscle atrophy under microgravity from its initial phase towards the recovery phase for the first time by comparing transcriptome data of skeletal muscle after 5 weeks stay in space and then after return to the earth with those on the earth. Based on these data, we will discuss roles of gravity in the maintenance / homeostasis of skeletal muscle.

List of Presentations

Furukawa S, Chatani M, Higashitani A, Numagga-Tomita T, Ogura T, Sato F, Sehara-Fujisawa A, Shinohara M, Shimazu T, Takahashi S, Watanabe T.（2021）Findings from recent studies by the Japan Aerospace Exploration Agency examining musculoskeletal atrophy in space and on Earth. *NPJ Microgravity* **7**: 18. doi: 10.1038/s41526-021-00145-9

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、(2) エンハンサー遺伝学に基づく新規ゲノム機能の解明、(3) ヒトとデバイスの相互作用に関する研究、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、がんに起因す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られにくくなる。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。がんが宿主に及ぼす影響の全貌が分かってないことがその一因であると考えられる。がんに起因する宿主の不調が、多臓器・多因子性の複雑な病態のあつまりであるため、その全貌を掴むことが難しいのだ。

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、という戦略を採用してきた。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撹乱し、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撹乱し、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、新規に同定した宿主因子の機能解析を進めた。特に、がんに起因する肝臓および脂肪の代謝異常に関わる因子について、代謝異常のどの部分にどのように関わるのかを明らかにした。本成果に関する演題を Cancer Cachexia Conference に提出したところ、talk session に選ばれ、当該領域の研究者たちと実りある議論をすることもできた。本宿主因子に関する研究はさまざまな展開を生んでおり、複数の細胞種が関与するような複雑な代謝ネットワークや、本因子が関与しない異常についての研究も鋭意進めているところである。以上の研究によって、がんに起因する宿主の病態生理という複雑な異常の全体像に迫っていきたい。

（2）エンハンサー遺伝学に基づく新規ゲノム機能の解明

本研究は、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のもつ意義を明らかにしようとするものである。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、胸腺細胞の非自己認識のメカニズムを明らかにした（*Nat. Commun*., 2019）。

本年度は、新規に同定したエンハンサーの機能解析に取り組んだ。本エンハンサーを欠損させたマウスでは肝臓におけるミトコンドリアの機能調節が損なわれ、代謝異常が生じていた。さらに、このマウスは代謝疾患に対して脆弱になっていた。上記の免疫系にとって重要なエンハンサーと合わせ、エンハンサーの新たな生理的意義の発見として本研究を推進したいと考えている。

（3）ヒトとデバイスの相互作用に関する研究

コロナ禍によってヒトとデバイスの距離はますます身近になった。コミュニケーションには遠隔対話システムが必須である。スマートフォンはもはや手放すことのできないデバイスである。子どもたちはゲームを使いながら対話をしている。アバターの利用もますます盛んになっている。このような状況の中の懸念として、デバイスの過度の使用が私たちにどのように影響するかがわかっていないということが挙げられる。私たちの研究グループでは、以上のようなデバイスの利用が生体にどのような影響を与えるのか、という新しい研究を開始した。本年度はそのための基盤作りに取り組んだ。

Our group studies（1）the mechanisms underlying host pathophysiology caused by cancers,（2）physiological roles of enhancers in vivo with the aid of enhancer genetics, and（3）human-device interactions.

（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. Indeed, host pathophysiology in cancers is a collection of multi-organ and multi-factorial abnormalities in various host organs. It is technically challenging to understand the entire picture of such a complex syndrome.

We aim to reveal the whole picture of host pathophysiology in cancers. 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 affects a cholesterol-metabolizing gene *cyp7a1* to exacerbate liver inflammation（*Dis. Model. Mech*., 2018）. We also found that breast cancer rewires liver circadian transcriptome and causes various problems in the liver（*Oncotarget*, 2017）.

In this fiscal year, we studied a novel host factor involved in cancer-induced metabolic abnormalities in the liver and adipose tissues. Cancer-induced metabolic abnormalities are diverse. Using multi-omics analysis, we uncovered which abnormalities the factor contributes to and the underlying mechanisms behind abnormalities. This study was selected in a talk session at Cancer Cachexia Conference 2021 and we had fruitful discussions with the researchers in this field. Extending this study, we are now aware of interesting interactions among various cell types in the cancer-bearing condition. Moreover, we are working on abnormalities that do not require this host factor but other host factors. On the basis of these, we want to understand the entire picture of complex pathophysiology caused by cancers.

（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: we know in vivo function of only 0.3% of enhancers so far. 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 studied a novel enhancer that we identified important for energy metabolism. Deletion of this enhancer in mice disrupt mitochondrial regulation and liver metabolism. Most importantly, mice lacking this enhancer became prone to metabolic disorders. Together with our previous publication（*Nat. Commun*., 2019）, we will keep exploring novel physiological and pathophysiological roles of *cis*-regulatory enhancers in vivo.

（3）Studies on human-device interactions

Due to the COVID-19 situation, the use of devices such as remote-communication systems became more prevalent worldwide. Smartphones are already essential for us. Kids communicate via gaming even when schools are closed. Many people use avatars in their communications. Yet, it has been unknown how the heavy use of these devices affects human physiology, giving rise to concerns in our community as exemplified by “smartphone addictions.” To deal with this, we launched our new study on human-device interactions. In this fiscal year, we worked on constructing the basis for this new study.

List of Publications

水野林、小林由佳、河岡慎平（2021）. 10xVisium による空間トランスクリプトーム解析 . 実験医学 *39*, 14:2200-2204.

List of Presentations

Kawaoka, S. Understanding host pathophysiology in cancers using multi-omics and genetics. The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. November 11-12, 2021.

Kawaoka, S. Multi-omics approach for understanding human physiology. Measuring mental-health change: brain, physiology, and gene, Tohoku University. October 29, 2021.

Kawaoka, S. Circadian disruption in diseases: an approach from enhancer genetics. Liason Lab Research Conference, Instutite of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University. October 22, 2021.

Kawaoka, S. Remote solid cancers rewire hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide-N-methyltransferase. Cancer Cachexia Conference 2021. Selected as a next-generation speaker. August 27-29, 2021.

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

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

2. 多能性幹細胞を用いた間葉系組織の研究

ヒト iPS 細胞は、無限の増殖能を有する多能性幹細胞であり様々な医学・医療応用が探索されている。我々は iPS 細胞から誘導した間葉系細胞に関して下記の研究を行っている。

1）iPS 細胞を用いた骨・軟骨分化過程の解析

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

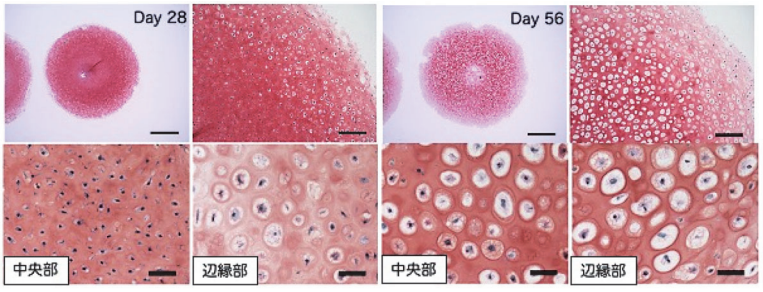


図 1. iPS 細胞から硬節まで誘導し、その後に軟骨分化誘導を開始して 14 日目より T3 を添加した。その結果 28 日目には形成された細胞塊の辺縁部が、56 日目には全体に肥大軟骨細胞が誘導された。

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）。

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 月より令和 3 年 3 月まで 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実施した。更に平成 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、病態解明ならびに創薬研究を行っており、複数の成長軟骨板を病態とする疾患に対して、開発した肥大軟骨細胞を誘導する培養法を用いて病態再現に成功した（図 2）。

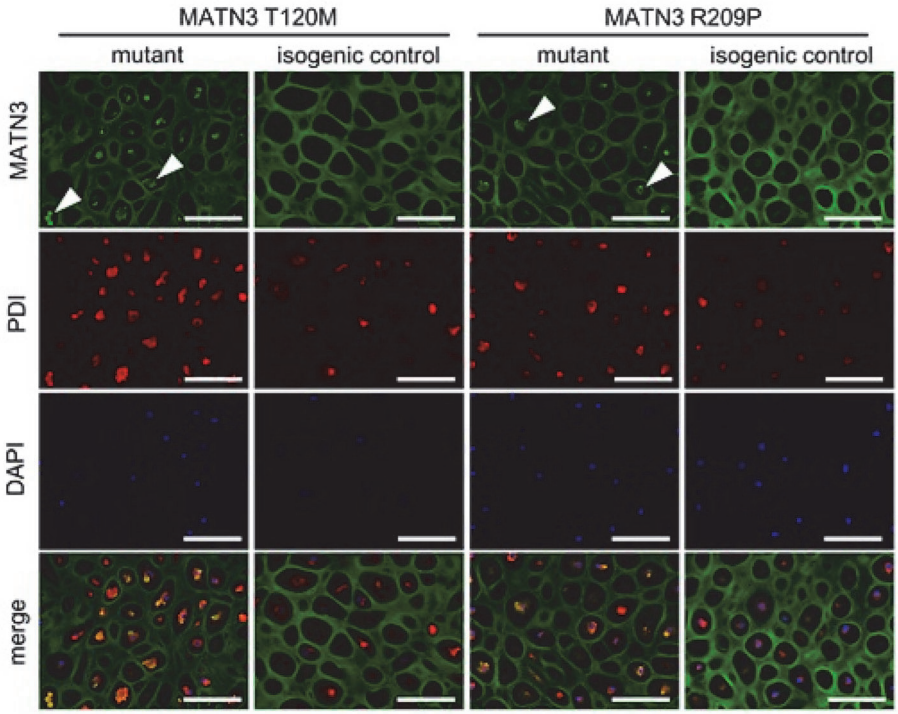


図 2. MATN3 遺伝子の変異 (T120M 及び R209P) を有する多発性骨端異形成症の患者 2 名より iPS 細胞を樹立し (mutant)、それぞれから変異修復細胞 (isogenic control) を作製し肥大軟骨を誘導した。変異細胞において細胞内に MATN3 が蓄積し、ER(PDI で標識）が腫大する病態が再現された。

3）肉腫起源細胞の探索

肉腫とは間葉系組織に発生する悪性腫瘍であり、臨床及び病理学的に極めて多様な腫瘍の集団で

ある。近年の遺伝子解析技術の進歩により、それぞれの腫瘍において腫瘍発生に深く関連する遺伝子異常（ドライバー変異）が明らかにされてきているが、起源細胞に関しては、その多くにおいて不明である。我々はドライバー変異を、新たに開発した薬剤誘導型発現ベクターを用いて多能性幹細胞に導入し、異なる分化段階で発現させることで、分化段階特異的なドライバー変異の影響を解析し、腫瘍の多様性の成因を明らかにするとともに、個別化治療の開発に寄与する情報を得ることを目指している現在、滑膜肉腫における SS18-SSX 融合遺伝子と、軟骨肉腫における変異 IDH1 遺伝子という二つのドライバー変異に関する研究を展開している。

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

1. Researches on mesenchymal stem cells

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

2. Researches on mesenchymal tissues using pluripotent stem cells

Human iPS cells are pluripotent stem cells with unlimited growth potential, and promising materials to apply for a variety of medical fields. We have been engaging following projects on mesenchymal tissues using iPS cells.

1）Investigation for the differentiation process of bone and cartilage cells using iPS cells.

We have been establishing the method to induce bone and cartilage cells from human iPS cells and also studying the molecular mechanisms of differentiation in detail. As for osteogenic differentiation, we established the multistep method to induce mesenchymal cells via neural crest, and also developed one-step method using retinoic acid signal. Using this one-step method, we have succeeded three-dimensional visualization of the bone-like nodule formation by the collaboration with Prof. Adachi of inFront, 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 performed multicenter double-blinded investigator-initiated clinical trial of this drug for FOP from September 2017 to March 2021.

In addition, we have 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（Figure 2）

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 in has been discovered in a number of tumors. Cell-of-origins of each tumor, however, are still missing in most of cases. Using PSCs with drug-inducible driver mutations, we analyze the effect of mutations in different stages of differentiation. This approach may help to explain the heterogeneity of tumors and also provide information for personalized medicine. We are now analyzing two driver mutations, IDH1/2 genes in chondrosarcomas and SS18-SSX fusion gene in synovial sarcoma.

List of Publications

Otani S, Date Y, Ueno T, Ito T, Kajikawa S, Omori K, Taniuchi I, Umeda M, Komori T, Toguchida J, Ito K.（2022）. Runx3 is required for oncogenic Myc upregulation in p53-deficient osteosarcoma. **Oncogene** 41, 683-91.

Nakamura A, Murata D, Fujimoto R, Tamaki S, Nagata S, Ikeya M, Toguchida J, Nakayama K.（2021）Bio-3D printing iPSC-derived human chondrocytes for articular cartilage regeneration. **Biofabrication** 13.

Yamada D, Nakamura M, Takao T, Takihira S, Yoshida A, Kawai S, Miura A, Ming L, Yoshitomi H, Gozu M, Okamoto K, Hojo H, Kusaka N, Iwai R, Nakata E, Ozaki T, Toguchida J, Takarada T.（2021）Induction

and expansion of human PRRX1+ limb-bud-like mesenchymal cells from pluripotent stem cells. **Nat Biomed Eng.** 5:926-40.

Goto K, Aoyama T, Toguchida J, Kuroda Y, Kawai T, Okuzu Y, Matsuda S.（2021）Ten-year results of mesenchymal stromal cell transplantation augmented with vascularised bone grafts for advanced osteonecrosis of the femoral head. **J Orthop.** 26:67-71.

Konishi E, Outani H, Mano M, Nagata S, Shirai T, Naka N, Hori Y, Takenaka S, Haga H, Toguchida J, Kakunaga S, Kuwae Y, Hoshi M, Inoue T, Aono M, Morinaga Y, Nakashima Y.（2021）Giant cell tumor of bone - Analysis of 213 cases involving extra-craniofacial bones. **Pathol Int**. 71:500-11.

Otsuki B, Okamoto T, Fujibayashi S, Sakamoto A, Toguchida J, Murata K, Shimizu T, Matsuda S.（2021）Rigid reconstruction with periacetabular multiple screws after the resection of malignant pelvic tumours involving the sacroiliac joint **Int Orthop.** 45:1793-802

Pretemer Y, Kawai S, Nagata S, Nishio M, Watanabe M, Tamaki S, Alev C, Yamanaka Y, Xue JY, Wang Z, Fukiage K, Tsukanaka M, Futami T, Ikegawa S, Toguchida J.（2021）Differentiation of hypertrophic chondrocytes from human iPSCs for the in vitro modeling of chondrodysplasias. **Stem Cell Reports.** 16: 610-25.

Matsuda M, Hayashi H, Garcia-Ojalvo J, Yoshioka-Kobayashi K, Kageyama R, Yamanaka Y, Ikeya M, Toguchida J, Alev C, Ebisuya M.（2021）. Species-specific segmentation clock periods are due to differential biochemical reaction speeds. **Science** 369, 1450-5.

前川裕継、戸口田淳也（2021）. 進行性骨化性線維異形成症 - 診断と管理法、予後、治療薬開発等について　整形外科領域の希少疾患診療　**整形・災害外科** 64:1091-7.

戸口田淳也（2021）. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた骨格系統疾患の病態解明から創薬へ　　再生医療はどこまで進んだか　**別冊 医学のあゆみ**　長船健二　編集　2021;82-7.

List of Presentations

Toguchida J. Translational research of bone and soft tissue sarcomas.（Symposium）. 13th APMTS, 2021 年 4 月 7 日 Okayama（WEB）.

Toguchida J, Hino K, Jin Y, Maekawa Y, Yoshitomi H, Ikeya M. APPLICATION OF DISEASE-SPECIFIC IPS CELLS FOR DISCLOSING THE PATHOMECHANISM AND DISCOVERING THERAPEUTIC CHEMICALS FOR INTRACTABLE DISEASES.（Symposium）ISSCR2021, 2021 年 4 月 26 日 Humberg（WEB）

Maekawa H, Jin Y, Nishio M, Kawai S, Nagata S, Kamakura T, Yoshitomi H, Niwa A, Saito MK, Matsuda S, Toguchida J. Monocytic lineage cells harboring mutant ACVR1 cause abnormal inflammation in response to Activin-A. ASBMR2021 2021 年 10 月 3 日 Tronto（WEB）.

戸口田淳也．　文系にも分かる iPS 細胞とその研究　2020 年度岡山大学経済学会大講演会 2021 年 1 月 20 日岡山（WEB）.

戸口田淳也 . 疾患特異的 iPS 細胞の骨系統疾患への応用 . 第 25 回大阪小児骨系統疾患研究会 2021 年 2 月 6 日大阪（WEB）

戸口田淳也、川井俊介、前川裕継、松田秀一 . 骨再生へのアプローチとしての異所性骨化機構の解析（シンポジウム）、第 20 回日本再生医療学会 2021 年 3 月 31 日

戸口田淳也、川井俊介、前川裕継 . 骨再生へのアプローチとしての異所性骨化病態の共通シグナルの解析（シンポジウム）. 第 42 回日本再生・炎症学会 2021 年 7 月 8 日 神戸（WEB）

戸口田淳也 . 疾患特異的 iPS 細胞の医療応用：現況と展望 . 理研 BRC20 周年記念シンポジウム 2021 年 10 月 21 日 つくば（WEB）

Toguchida J. Application of patient-specific iPS cells for intractable skeletal diseases. KUMBL and Boehringer Ingelheim Cosponsored Symposium. 2021.10.22 京都（WEB）

戸口田淳也 . 再生医療に期待すること、あるべき姿 . とっとりバイオフロンティア設立 10 周年記念シンポジウム 2021 年 10 月 24 日米子（WEB）

野口貴志、坂本昭夫、松田秀一、戸口田淳也 . 腕神経叢周囲発生の神経鞘腫の治療と神経脱落症状に関する調査 . 第 54 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 2021 年 7 月 16 日広島（WEB）

Kamakura T, Jin Y, Tamaki S, Watanabe M, Okamoto T, Yoshitomi H, Toguchida J. Mutant IDH1 triggers oncogene-induced senescence in normoxia. 第 54 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 2021 年 7 月 16 日広島（WEB）

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 .Mutant IDH1 triggers Oncogene-Induced Senescence in normoxia. 第 80 回日本癌学会総会 2021 年 9 月 30 日横浜（WEB）

川井俊介、戸口田淳也 . 同胞発生患者由来 IPS 細胞を用いた、後縦靱帯骨化症の遺伝的要因の探索と創薬 . 第 39 回日本骨代謝学会学術集会 2021 年 10 月 8 日 神戸（WEB）

明璐、山田大祐、高尾知佳、戸口田淳也、宝田剛志 . ヒト多能性幹細胞由来軟骨前駆細胞を用いた硝子軟骨組織作製技術の開発 . 第 39 回日本骨代謝学会学術集会 2021 年 10 月 8 日神戸（WEB）

Yann Pretemer、川井俊介、永田早苗、西尾恵、玉置さくら、二見徹、池川志郎、戸口田淳也 . ヒト iPS 細胞由来肥大軟骨細胞による遺伝性成長板疾患の病態解析 . 第 39 回日本整形外科学会基礎学術集会 2021 年 10 月 14 日伊勢（WEB）

太田章、Yann Pretemer、川井俊介、西尾恵、布施広光、山岸幸子、松田秀一、戸口田淳也 . 自動培養システムを用いたヒト iPS 細胞由来肥大軟骨細胞の誘導 . 第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会 2021 年 10 月 14 日伊勢（WEB）

Nakamura AM, Murata D, Fujimoto R, Nakayama K, Ikeya M, Toguchida J. Scaffold-free cartilage

constructs for large chondral defects fabricated using bio-3D printe. 第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会 2021 年 10 月 14 日伊勢（WEB）.

山田大祐、高尾知佳、中村正裕、戸口田淳也、宝田剛志 . ヒト多能性幹細胞からの軟骨前駆細胞の誘導とその拡大培養方法の開発 . 第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会 2021 年 10 月 14 日伊勢（WEB）

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 44 回日本分子生物学会年会 2021 年 12 月 1 日 横浜（WEB）

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

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

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

【多田グループ】

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

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

1）iRS 細胞を用いた再プログラム化機構の解明

iRS 細胞は低密度培養により安定に長期間の増殖維持ができる一方、培養条件の変更のみで iPS 細胞への再プログラム化を再開できる新たな再プログラム化中間細胞株である。培養条件を低密度から高密度培養に変更すると、約 1 週間で iPS 細胞コロニーが高効率で出現する。加えて、単一 iRS 細胞からの増殖が可能であることが、遺伝子改変処理後の陽性クローンの選別を容易にしている。ゲノム編集により内在性 *OCT4* 遺伝子の下流に蛍光マーカー遺伝子 *GFP* をノックインし、可視化した（Fig. 1）。

その結果、1）外来性再プログラム化因子の不活性化と同時に内在性 *OCT4* 遺伝子が活性化、2）内在性 *OCT4* 遺伝子活性の後に MET（Mesenchymal-Epithelial Transition）が起こる、3）MET 直後の *OCT4* の活性は不安定で、その後安定化することが明らかになった。iRS 細胞でのゲノム編集は、再プログラム化の分子機構解明に新たな展開をもたらすと期待される。

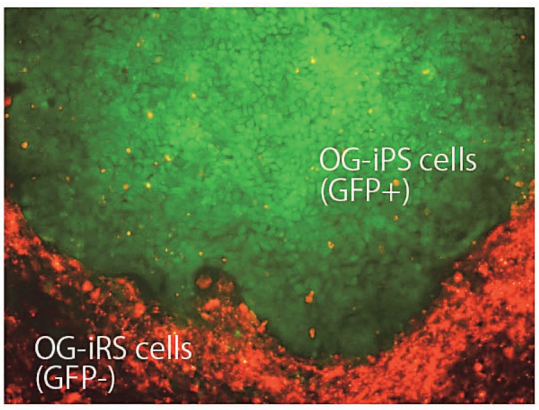


Fig.1. A GFP-positive iPS cell colony converted from OG-iRS cell

2）ヒト ADIPONECTIN と再生

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。

【Tada Group】

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

1）Molecular mechanisms in iRS cell reprogramming to iPS cell

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

2）Plasma and nuclear ADIPONECTIN

Plasma ADIPO functioning in anti-inflammation of the blood vessel and muscle is known as an anti-aging cytokine, which is mainly secreted from adipocytes, and circulated on blood flow. We found that ADIPO is localized at nuclei of cells from several tissues, including stem and germ cells. Nuclear ADIPO is characterized by truncated, and monomeric protein form. Overexpression of nuclear ADIPO induces apoptotic cell death. Nuclear ADIPO plays a role in micro-RNA-mediated post-transcription regulation, cell-cell interaction, and chromatin remodeling.

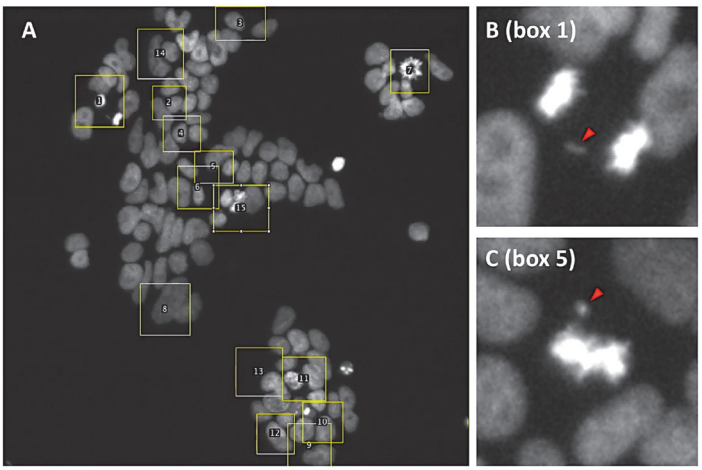
【中馬グループ】

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発現制御を示すものがある。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 DNA 損傷に対する細胞周期制御、チェックポイント制御や代謝制御、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、新規因子の表現型解析と遺伝的安定性の再構成実験を行っている。また、ヒト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解析、画像解析技術等）の研究開発を進めている。

【Chuma Group】

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



Live imaging of histone H2B-mCherry transgenic mES cells (A) and chromosome segregation errors during mitotic divisions (B, C)

List of Publication

Chuma S, Kanatsu-Shinohara M, Katanaya A, Hosokawa M, Shinohara T. Genomic stability of mouse spermatogonial stem cells in vitro. Sci Rep. 2021 Dec 17;11（1）:24199.

Anand D, Al Saai S, Shrestha SK, Barnum CE, Chuma S, Lachke SA. 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. 2021 Feb 16;9:615761.

List of Presentation

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「全能性プログラム」領域会議 . ZOOM. 2021.11.17

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機能解析を試みた。一方、自己免疫性関節炎マウスモデルを用いて、炎症関連細胞死プログラムである Necroptosis および Pyroptosis が関節炎の発症、慢性化に関与しないことを明らかにした。このことは、多量のネクローシスが付随する病態であっても、獲得免疫応答の維持と組織炎症の慢性化に特定の炎症関連細胞死プログラム経路が必ずしも必要ないことが示唆された。

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機能解析

マウス精子は、段階的な成熟過程を経ることで受精能を獲得することが知られている。我々は、先行研究において受精能獲得過程にある精子の膜表面では GPI アンカー型タンパク質（GPI-AP）遊離とラフト局在変化が連動して起こり、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。その中のひとつは、精子集団を 2 分するマーカー分子として有用であることがわかり、一群の精子が受精をコントロールしている可能性が示唆された。また、もうひとつの分子のノックアウトマウスでは、産仔数が増加傾向にあり、生体内で受精を負に制御する分子の存在が示唆された。

2）免疫寛容維持機構と T ヘルパー細胞の制御機構

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

本年度、自己免疫性関節炎（SKG）マウスを用いて、炎症性 T ヘルパー細胞依存的な関節炎の発

症、重症化は炎症関連細胞死プログラムである Necroptosis および Pyroptosis 経路とは独立した炎症維持機構によって制御されていることを明らかにした。

関節の滑膜炎症に寄与する炎症性 T ヘルパー細胞、滑膜ストローマ細胞、滑膜自然リンパ球がどのような外的環境因子、炎症関連細胞死プログラム（Necroptosis, Pyroptosis など）によってクロストークし組織炎症を維持させているのか、不明な点が多い。

炎症関連細胞死プログラムである Necroptosis および Pyroptosis 経路が関節炎発症、増悪化機構に関与するかどうか解析するため、それぞれの鍵となる分子 Ripk3 と Gsdmd を欠損したマウス（Balb/c 背景）を CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。

予想に反し、Ripk3 KO SKG と Gsdmd KO SKG マウスは、コントロール SKG マウスと同様に関節炎が誘導された。また、これら経路はインターロイキン -17 産生の炎症性 T ヘルパー細胞および $Foxp3^+$ 制御性 T 細胞の分化、遊走、活性化にも影響を与えず、両経路非依存的な IL-1β 産生も認められた。本研究によって、多量のネクローシスが付随する慢性炎症病態であっても、自己免疫性関節炎の病態発症および炎症維持にこれら両経路が関与しないことを明らかにした。

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 2021, we attempted to analyse functions of novel GPI-anchored proteins that play important roles in the process by which mouse sperm acquire fertility. Moreover, using a mouse model of autoimmune arthritis, we demonstrated that the inflammation-related cell death programs necroptosis and pyroptosis are not involved in the development of autoimmune arthritis. Therefore, a specific inflammation-related cell death program pathway is not necessarily required for the maintenance of the adaptive immune response and chronic tissue inflammation even in the pathological condition associated with a large amount of necrosis.

1）Functional analysis 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. One of them was found to be useful as a marker molecule that divides the sperm population, suggesting that a group of sperms may control fertilization. In addition, in the knockout mouse of another molecule, the number of offspring tended to increase, suggesting the existence of a molecule that negatively controls fertilization in vivo.

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

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

Using SKG mice, a mouse model of autoimmune arthritis, we showed that the onset and aggravation of inflammatory T helper cell-dependent arthritis is independent of the necroptosis and pyroptosis pathways, which are inflammation-related cell death programs.

Inflammatory T helper cells, synovial stromal cells, and synovial innate lymphoid cells contribute to synovial inflammation of joints, but it remained unclear whether inflammation-related cell death programs（necroptosis, pyroptosis, etc.）could modulate the function of those inflammatory cells.

To analyze whether the inflammation-related cell death programs necroptosis and pyroptosis are involved in the development of arthritis, the CRISPR/Cas9 system was used for the generation of Ripk3 and Gsdmd KO mice, whose molecules are key for the necroptosis and pyroptosis pathways, respectively.

Unexpectedly, Ripk3 KO SKG and Gsdmd KO SKG mice developed arthritis similar to control SKG mice. In addition, these pathways did not affect the differentiation, migration, or activation of interleukin-17-producing inflammatory T helper cells and $Foxp3^{+}$ regulatory T cells. Notably, there was IL-1β production independently of the both pathways. This study revealed that both of these pathways are not involved in the pathogenesis and maintenance of autoimmune arthritis, even in chronic inflammatory conditions associated with a large amount of necrosis.

List of Publications

Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, Sakaguchi N, Sakaguchi S, **Kondoh G**, Morinobu A, Mimori T, **Hirota K**. Dispensable roles of Gsdmd and Ripk3 in sustaining IL-1β production and chronic inflammation in Th17-mediated autoimmune arthritis. ***Sci Rep***. 11:18679.（**2021**）.

Shirakashi M, Maruya M, **Hirota K**, Tsuruyama T, Matsuo T, Watanabe R, Murata K, Tanaka M, Ito H, Yoshifuji H, Ohmura K, Elewaut D, Sakaguchi S, Fagarasan S, Mimori T, Hashimoto M. Effect of Impaired T Cell Receptor Signaling on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Systemic Autoimmunity. ***Arthritis Rheumatol***. 2021 Nov 1. Online ahead of print.

Kawakami R, Kitagawa Y, Chen KY, Arai M, Ohara D, Nakamura Y, Yasuda K, Osaki M, Mikami N, Lareau CA, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**, Ohkura N, Sakaguchi S. Distinct Foxp3 enhancer elements coordinate development, maintenance, and function of regulatory T cells. ***Immunity***. 54:947-961. e8.（**2021**）.

Nakagawa, T., Jörg, D. J., **Watanabe, H.,** Mizuno, S., Han, S., Ikeda, T., Omatsu, Y., Nishimura, K., Fujita, M., Takahashi, S., **Kondoh, G.,** Simons, B. D., Yoshida, S. and Nagasawa, T. A multistate stem cell dynamics maintains homeostasis in mouse spermatogenesis. ***Cell Reports***, Oct 19;37（3）:109875. doi:

10.1016/j.celrep.2021.109875.

小原乃也、**廣田圭司**「自己免疫疾患に関わるT細胞の制御因子：創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術」：**技術情報協会** p.203-213、2021年8月31日発刊

廣田圭司「炎症性Th17細胞による組織炎症の形成」：**炎症と免疫**、先端医学社29巻5号15-17、2021年8月20発行

廣田圭司「臨床医が知っておくべき免疫学のいま：Pathogenicヘルパー T細胞と組織炎症」：**別冊・医学のあゆみ**、医歯薬出版株式会社 p48-53、2021年8月25発行

List of Presentations

Ohara D, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**：Foxp3+ regulatory T cells suppress chronic inflammation and fibrosis in the liver by regulating tissue cellular immunity in CCl4-induced liver injury. The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2021 Dec. 8-10

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**
特定助教	**川上　竜司**	**Project Assist. Prof.**	**Ryoji Kawakami**

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。2021 年度、Treg の基礎研究では、Treg の発生・分化機構および免疫抑制機構について研究を進めた。

Treg の発生には、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。本年度、Treg の分化と機能に重要な転写因子である Foxp3 遺伝子領域周辺に、T 細胞分化の初期から活性化している CNS0（conserved non-coding sequence 0）、CNS3 領域と呼ばれる 400 塩基対と 200 塩基対の非コード DNA 領域を見出した（Kawakami, Kitagawa et al., Immunity, 2021）。共に、ヒトを含む多くの哺乳類 DNA で進化的保存度が高く、Treg の発生･機能に重要と考えられた。そこで、CNS0、CNS3 領域のそれぞれ、または両方を欠損するマウスを CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術で作成したところ、片方だけを欠損したマウスは、Treg のわずかに減少を示すのみで正常に発育したが、両方とも同時に欠損したマウスは胸腺での正常な Treg 分化が阻害され、Treg の欠損による全身性の重篤な自己免疫疾患を発症した。また、CNS0、CNS3 領域は、Treg の胸腺内分化過程で、Foxp3 遺伝子のプロモータ領域と立体的に相互作用し協調的に Foxp3 遺伝子の発現を調節すると考えられた。即ち、Treg 機能遺伝子の構造的異常のみならず、非コード領域の変異による遺伝子発現異常によっても自己免疫病が誘導される可能性を示した。

Treg は、抗原提示細胞（antigen-presenting cells、以下 APC）の共刺激分子 CD80/CD86 の発現を抑制することで通常 T 細胞（conventional T cells, 以下 Tonv と略）の活性化を抑制している。その分子機構について研究を進め以下の点を明らかにした（Tekguc et al., PNAS, 2021）。第一に、Treg が APC、特に樹状細胞上の抗原ペプチド /MHC によって活性化される際、Treg に高発現する CTLA-4 は、APC 上の CD80/CD86 と高親和性に結合し、trogocytosis, それに続く endocytosis によって CD80/CD86 分子を APC 表面から奪い、その結果、T 細胞に発現する CD28 分子を介する副刺激を減弱化させ、T 細胞、特にナイーブ（抗原非感作）T 細胞の活性化・増殖を抑制した。さらに、APC は共刺激分子 CD80/CD86 に加えて、PD-L1 を発現しており、その大部分は CD80 と結合状態にあるが、Treg が CTLA-4 を介して APC 上の CD80 の発現を低下させると、APC 上に free PD-L1 が増加し、それに反応する PD-1^{+} エフェクター T 細胞をも抑制することになる。即ち、Treg は、APC 上の CD80/CD86 共刺激分子、PD-L1 共阻害分子の発現制御を介して、ナイーブ T 細胞の活性化のみならず

PD-1^{+} エフェクター T 細胞の機能も抑制していることが明らかになった。従って、Treg による APC 上の CD80/CD86 発現制御が抗 CTLA-4 ブロッキング抗体によって阻害されれば、CD80/CD86 の発現増強、free PD-L1 の発現減少が起き、その結果 APC による T 細胞活性化が増強され、がん免疫応答を亢進させるのみならず、自己免疫をも惹起する。また、抗 CTLA-4、抗 PD-1 抗体の併用は、この Treg 依存性 CD80/CD86 および PD-L1 発現制御を介して、ナイーブ T 細胞、エフェクター T 細胞共に活性化し、がん免疫、自己免疫をさらに増強すると考えられた。

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 mechanism of immunologic self-tolerance; and（iii）the cause and pathogenetic mechanism of autoimmune diseases, in particular, rheumatoid arthritis.

The transcription factor Foxp3 plays crucial roles for Treg development and function. Conserved non-coding sequences（CNSs）at the *Foxp3* locus control *Foxp3* transcription, but how they developmentally contribute to Treg cell lineage specification remains obscure. We have shown that among *Foxp3* CNSs, the promoter-upstream CNS0 and the intergenic CNS3, which bind distinct transcription factors, are activated at early stages of thymocyte differentiation prior to *Foxp3* promoter activation, with sequential genomic looping bridging these regions and the promoter. While deletion of either CNS0 or CNS3 partially compromises thymic Treg cell generation, deletion of both completely abrogates the generation and impairs the stability of Foxp3 expression in residual Treg cells. As a result, CNS0 and CNS3-double-deleted mice succumb to lethal systemic autoimmunity and inflammation. Thus, hierarchical and coordinated activation of *Foxp3* CNS0 and CNS3 initiates and stabilizes *Foxp3* gene expression, thereby crucially controlling Treg cell development, maintenance, and consequently immunological self-tolerance（Kawakami, Kitagawa et al., Immunity. 2021）.

Foxp3-expressing CD4^{+}CD25^{+} Tregs constitutively and highly express the immune checkpoint receptor CTLA-4, whose Treg-specific deficiency causes severe systemic autoimmunity. As a key mechanism of Treg-mediated suppression, Treg-expressed CTLA-4 downregulates the expression of CD80/CD86 costimulatory molecules on antigen-presenting cells（APCs）. We have shown that Treg-expressed CTLA-4 facilitates Treg-APC conjugation and immune synapse formation. The immune synapses thus formed provide a stable platform whereby Tregs are able to deplete CD80/CD86 molecules on APCs by extracting them via CTLA-4-dependent trogocytosis. The depletion occurs even with Tregs solely expressing a mutant CTLA-4 form lacking the cytoplasmic portion required for its endocytosis. Furthermore, CD80 downregulation or blockade by Treg-expressed membrane CTLA-4 or soluble CTLA-4 Ig, respectively, disrupts cis-CD80/PD-L1 heterodimers and increases free PD-L1 on dendritic cells（DCs）, expanding a phenotypically distinct population of CD80^{lo} free-PD-L1^{hi} DCs. Taken together, Tregs are able to inhibit the T-cell stimulatory activity of APCs by reducing their CD80/CD86 expression via CTLA-4-dependent trogocytosis. This CD80/CD86 reduction on APCs is able to exert dual suppressive effects on T-cell immune responses by limiting CD80/CD86 costimulation to naïve T cells and by increasing free-PD-L1 available for the inhibition of PD-1

expressing effector T cells. Blockade of CTLA-4 and PD-1/PD-L1 in combination may therefore synergistically hinder Treg-mediated immune suppression, thereby effectively enhancing immune responses including tumor immunity（Tekguc et al., PNAS, 2021）.

List of Publications

1）原著論文

1. Tulyeu J, Søndergaard JN, Sakaguchi S*, Wing JB*（*co-corresponding authors）. Isolation and Characterization of Both Human and Mouse Tfh/Tfr Cells. *Curr Protoc.* 2021 Nov;1（11）:e283. doi: 10.1002/cpz1.283. PMID: 34748274.

2. Mikami T, Kato I, Wing JB, Ueno H, Tasaka K, Tanaka K, Kubota H, Saida S, Umeda K, Hiramatsu H, Isobe T, Hiwatari M, Okada A, Chiba K, Shiraishi Y, Tanaka H, Miyano S, Arakawa Y, Oshima K, Koh K, Adachi S, Iwaisako K, Ogawa S, Sakaguchi S, Takita J. Alteration of the immune environment in bone marrow from children with recurrent B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci.* 2021 Oct 30. doi: 10.1111/cas.15186. Epub ahead of print. PMID: 34716967.

3. Takeuchi Y, Ohara D, Watanabe H, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Kondoh G, Morinobu A, Mimori T, Hirota K. Dispensable roles of Gsdmd and Ripk3 in sustaining IL-1β production and chronic inflammation in Th17-mediated autoimmune arthritis. *Sci Rep.* 2021 Sep 21;11（1）:18679. doi: 10.1038/s41598-021-98145-y. PMID: 34548542; PMCID: PMC8455622.

4. Shirakashi M, Maruya M, Hirota K, Tsuruyama T, Matsuo T, Watanabe R, Murata K, Tanaka M, Ito H, Yoshifuji H, Ohmura K, Elewaut D, Sakaguchi S, Fagarasan S, Mimori T, Hashimoto M. Effect of impaired T-cell receptor signaling on the gut microbiota and systemic autoimmunity. *Arthritis Rheumatol.* 2021 Nov 1. doi: 10.1002/art.42016. Epub ahead of print. PMID: 34725966.

5. Sakaguchi S. Taking regulatory T cells into medicine. *J. Exp. Med.* 2021 May 26; 218（6）: e20210831. doi: 10.1084/jem.20210831.

6. Tekguc M, James Badger Wing JB, Osaki M, Long J, Sakaguchi S. Treg-expressed CTLA-4 depletes CD80/CD86 by trogocytosis, releasing free PD-L1 on antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Jul 27;118（30）:e2023739118. doi: 10.1073/pnas.2023739118.

7. Parajuli G, Tekguc M, Wing JB, Hashimoto A, Okuzaki D, Hirata T, Sasaki A, Itokazu T, Handa H, Sugino H, Nishikawa Y, Metwally H, Kodama Y, Tanaka S, Sabe H, Yamashita T, Sakaguchi S, Kishimoto T, Hashimoto S. Arid5a promotes immune evasion by augmenting tryptophan metabolism and chemokine expression. *Cancer Immunol Res.* 2021 May 18:canimm.0014.2021. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-21-0014.

8. Mikami N, Tani H, Kawakami R, Sugimoto A, Sakaguchi S, Ikuta T. Brazilian green propolis promotes TNFR2 expression on regulatory T cells. *Food Sci Nutr.* 2021 Apr 7;9（6）:3200-3208. doi: 10.1002/

fsn3.2281. PMID: 34136184; PMCID: PMC8194755.

9. Mimitou EP, Lareau CA, Chen KY, Zorzetto-Fernandes AL, Hao Y, Takeshima Y, Luo W, Huang T, Yeung BZ, Papalexi E, Thakore PI, Kibayashi T, Wing JB, Hata M, Satija R, Nazor KL, Sakaguchi S*, Ludwig LS*, Sankaran VG*, Regev A*, Smibert P*（* senior authors）. Scalable, multimodal profiling of chromatin accessibility, gene expression, and protein levels in single cells. *Nat. Biotech.* 2021 Jun 3. doi: 10.1038/s41587-021-00927-2.

10. Yang Y, Li X, Ma Z, Wang C, Yang Q, Byrne-Steele M, Hong R, Min Q, Zhou G, Cheng Y, Qin G, Youngyunpipatkul JV, Wing JB, Sakaguchi S, Toonstra C, Wang LX, Vilches-Moure JG, Wang D, Snyder MP, Wang JY, Han J, Herzenberg LA. CTLA-4 expression by B-1a B cells is essential for immune tolerance. *Nat Commun.* 2021 Jan 22;12（1）:525. doi: 10.1038/s41467-020-20874-x. PMID: 33483505; PMCID: PMC7822855.

11. Kawakami R, Kitagawa Y, Chen KY, Arai M, Ohara D, Nakamura Y, Yasuda K, Osaki M, Mikami N, Lareau CA, Watanabe H, Kondo G, Hirota K, Ohkura N, and Sakaguchi S. Coordinated activation of distinct Foxp3 enhancer elements for Treg development, maintenance, and immunological self-tolerance. *Immunity.* 2021 May 11;54（5）:947-961.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2021.04.005.

12. Shime H, Odanaka M, Tsuiji M, Matoba T, Imai M, Yasumizu Y, Uraki R, Minohara K, Watanabe M, Bonito AJ, Fukuyama H, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A, Yamazaki S. Reply to Slominski et al.: UVB irradiation induces proenkephalin^{+} regulatory T cells with a wound-healing function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021 Jan 19;118（3）:e2021919118. doi: 10.1073/pnas.2021919118. PMID: 33414270; PMCID: PMC7826361.

2）総説

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

学会等の講演

1）講演・シンポジウム

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

Shimon Sakaguchi: Discovery of T-Regulatory Cells and Their Role in The Immune System. UCL Immunology Society（2021.3.30. London, UK / Web meeting）国外

Shimon Sakaguchi: Conversion of effector/memory T cells into Tregs for antigen-specific immune suppression. 5th International Immunological Memory and Vaccine Forum（IIMVF）: Educating the immune system: Good and bad memory（2021.4.15. Berlin, Germany / Web meeting）国外

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御　第 9 回 Osaka Basic Science Seminar in Dermatology（2021.5.19. 大阪／ Web meeting）国内

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 25 回腸内細菌学会学術集会（2021.6.1. 東京／ Web meeting）国内

坂口志文：制御性 T 細胞を標的とした新しいがん免疫療法　第 29 回日本乳癌学会学術総会（2021.7.1. 横浜／ Web meeting）国内

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御と免疫疾患　第 42 回日本炎症・再生医学会（2021.7.7. 東京／ Web meeting）国内

坂口志文：制御性 T 細胞を標的とした新しい免疫医療について　第 17 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム（2021.7.10. 広島／ Web meeting）国内

Shimon Sakaguchi: Control of Immune Responses by Regulatory T Cells. 6th European Congress of Immunology（ECI2021）（2021.9.1. Web meeting）国外

坂口志文:制御性 T 細胞研究の 40 年　第 29 回日本組織適合性学会大会（2021.9.4. Web meeting）国内

坂口志文：制御性 T 細胞の発生と機能　免疫サマースクール 2021（2021.9.14. Web meeting）国内

坂口志文:新しい免疫治療に向けて : 自己と非自己の免疫学　第 28 回ヘルスカウンセリング学会大会（2021.9.26. Web meeting）国内

Shimon Sakaguchi: Targeting regulatory T cells for antigen-specific control of immune responses. The 19th Awaji International Forum on Infection and Immunity（2021.9.28. Web meeting）国外

坂口志文：制御性 T 細胞を標的とする免疫医療の現状と展望　ACT japan フォーラム　アカデミア臨床開発 Update ～免疫細胞療法のサイエンス～（2021.10.1. 大阪／ Web meeting）国内

坂口志文:新しい免疫医療に向けて　第 53 回藤田医科大学医学会学術大会　（2021.10.8. 愛知／ Web meeting）国内

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御　第 29 回日本消化器関連学会週間（2021.11.4. 神戸／ Web meeting）国内

坂口志文 : 免疫学が開く新たな医療　関西経済人・エコノミスト会議 2021（2021.11.26. 大阪）国内

坂口志文：制御性 T 細胞によるがん予防薬開発最前線　世界がん撲滅サミット 2021 in OSAKA（2021.12.5. 大阪）国内

Shimon Sakaguchi: Induction of tumor immunity with long-lasting memory by depleting clonally expanding

Tregs in tumor tissues. The 2nd ImmunoSensation2 – IFReC Joint Workshop（Online）（2021.12.16-17. 大阪・Germany ／ Web meeting）国外

2）学会・研究会発表

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）

安水良明：一細胞 RNAseq 解析による重症筋無力症特異的な神経関連分子発現を行う胸腺上皮細胞の同定　第 33 回日本神経免疫学会学術集会（2021.10.21. 福岡／ Web meeting）

Yoshiaki Yasumizu, Hisashi Murata, Makoto Kinoshita, Satoshi Nojima, Naganari Ohkura, Tatsusada Okuno, Shimon Sakaguchi. The integrative analysis of large-scale bulk and single-cell RNAseq revealed neuromuscular molecules production by nmTEC in myasthenia gravis related thymoma. 第 50 回日本免疫学会学術集会（2021.12.8-10. 奈良／ Web meeting）

Kenji Ichiyama, Shimon Sakaguchi, Chen Dong. Cooperative and distinct function of SRC2 and SRC3 in Th17 cell development. 第 50 回日本免疫学会学術集会（2021.12.8-10. 奈良／ Web meeting）

Ryoji Kawakami, Yohko Kitagawa, Kelvin Y. Chen, Masaya Arai, Daiya Ohara, Yamami Nakamura, Keiko Yasuda, Motonao Osaki, Norihisa Mikami, Caleb A. Lareau, Hitomi Watanabe, Gen Kondoh, Keiji Hirota, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi. Contribution of T cell receptor- and Interleukin-2-signaling to the coordination of Treg-associated enhancer landscape. 第 50 回日本免疫学会学術集会（2021.12.8-10. 奈良／ Web meeting）

Hiroaki Shime, Mizuyu Odanaka, Makoto Tsuiji, Masaki Imai, Yoshiaki Yasumizu, Ryuta Uraki, Anthony JB, Hidehiro Fukuyama, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Akimichi Morita, Sayuri Yamazaki. Proenkephalin+ regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure maintain skin homeostasis with a healing function. 第 50 回日本免疫学会学術集会（2021.12.8-10. 奈良／ Web meeting）

Mizuyu Odanaka, Hiroaki Shime, Makoto Tsuiji, Masaki Imai, Yoshiaki Yasumizu, Ryuta Uraki, Anthony JB, Hidehiro Fukuyama, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Akimichi Morita, Sayuri Yamazaki. Skin regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure have a unique gene expression profile compared to other tissue Treg cells. 第 50 回日本免疫学会学術集会（2021.12.8-10. 奈良／ Web meeting）

Yujiro Kidani, Yoshiaki Yasumizu, Atsushi Tanaka, Hisashi Wada, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi. CCR8-targeted specific depletion of clonally expanded Treg cells in tumor tissues evokes potent tumor immunity with long-lasting memory. 第 50 回日本免疫学会学術集会（2021.12.8-10. 奈良／ Web meeting）

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 ｹﾈﾃﾞｨ**	**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。2021 年においては、骨細胞の高解像度 image-based モデルを用いたシミュレーション解析により、骨細胞周囲の微細構造が骨細胞突起に局所膜ひずみ集中を引き起こすことを明らかにした。また、一軸固定境界条件下のコラーゲンゲル上で骨芽細胞を培養し、細胞内張力が骨分化にともなう骨細胞の配向を誘導する可能性を見出した。

1）高解像度 Image-based 解析による骨細胞突起の局所膜ひずみ評価

骨の構造は、荷重に応じた骨の吸収・形成からなる骨リモデリングにより、生涯を通じて変化する。骨リモデリングの司令細胞として知られる骨細胞は、その細胞突起において、骨細管内の間質液流れにともなう力学刺激を感知すると考えられている。この骨細胞のメカノセンシング機構においては、骨細胞突起と骨細管壁をつなぐテザリングエレメントと呼ばれる構造物や、骨細胞突起および骨細管壁の複雑な形状が、骨細胞への力学刺激に大きな影響を及ぼすことが予想されるが、その詳細なメカニズムは未解明であった。本研究では、そのような骨細胞周囲の微細構造が、骨細胞のメカノセンシング機構において果たす役割を明らかにすることを目的とした。まず、超高圧電子顕微鏡画像に基づき、骨細胞突起と骨細管壁の高解像度 Image-based モデルを構築した。このモデル内部にテザリングエレメントを配置し、流体－構造連成解析を行うことにより、骨細管内の間質液流れにともなう骨細胞突起の膜ひずみ分布を評価した（Fig. 1）。その結果、骨細胞突起には、局所的に大きな膜ひずみが集中する領域が存在し、そのような局所ひずみ集中は、大きな張力を生じている少数のテザリングエレメントの周辺に発生することが明らかとなった。さらに、テザリングエレメントに生じる張力は、骨細胞突起および骨細管の複雑な形状に起因したテザリングエレメントの傾きに関連していることが示唆された。

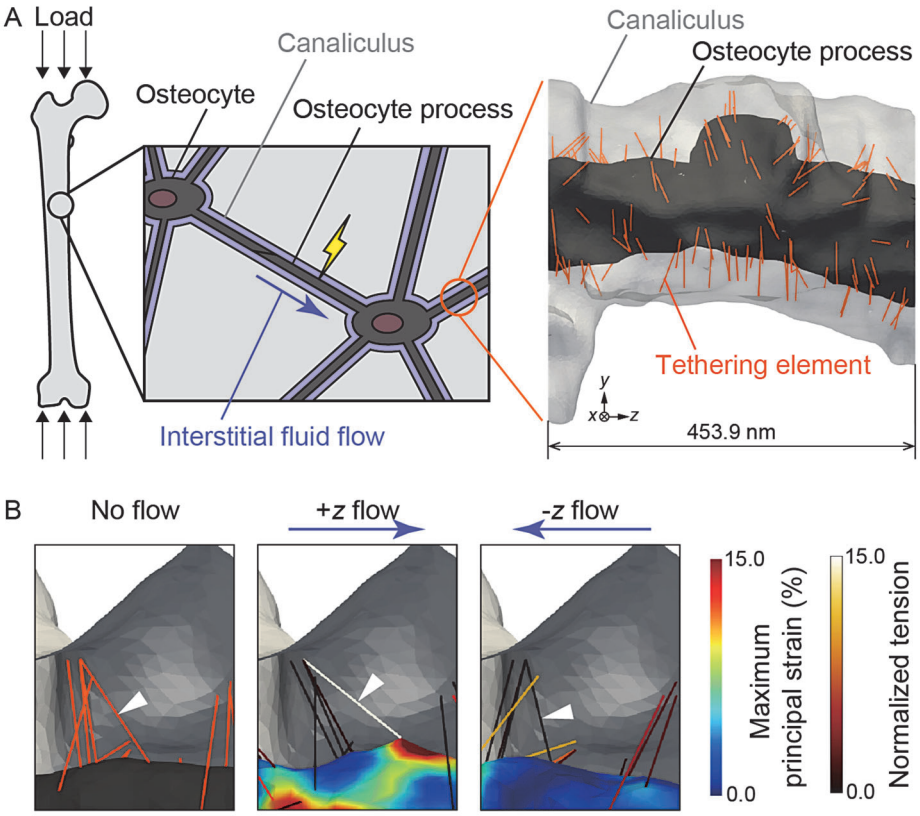


Fig. 1. Fluid–structure interaction simulation using a high-resolution image-based model.（A）Construction of a high-resolution image-based model of an osteocyte process and a canaliculus.（B）Flow-induced strain on the osteocyte process membrane and tension of TEs.（Yokoyama et al., 2021）

2）一軸固定境界条件下にあるコラーゲンゲル上の培養骨芽細胞・骨細胞の配向誘導

骨芽細胞から分化した骨細胞は、骨リモデリング調節においてメカノセンサーとして重要な役割を果たす。海綿骨の骨梁表面に垂直な方向に細胞突起を有する骨細胞からなるネットワークは、細胞による力学的刺激の感知および骨基質内における細胞間コミュニケーションに大きな影響を及ぼすことが予想される。しかしながら、その骨細胞ネットワークの形成メカニズムについては、未だに不明な点が多く残されている。本研究は、マウス骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を一軸固定境界条件下にあるコラーゲンゲル上で培養することで細胞配向を誘導する新しい in vitro 培養システムを開発した（Fig. 2）。ミオシン II 阻害剤である blebbistatin を用いた実験により、細胞骨格アクチンフィラメントの収縮を介して、細胞内張力が細胞配向に寄与することを示した。また、コラーゲンゲル上で播種された細胞は、ゲル内部に自発的に移動し、固定された一軸方向に部分的に配向し、骨芽細胞・骨細胞分化遺伝子発現が促進した。これらの結果は、一軸に固定された力学的境界条件下で生じる細胞内張力が、骨基質内の骨細胞の配向した整列を決定する要因の 1 つである可能性を示唆するものである。

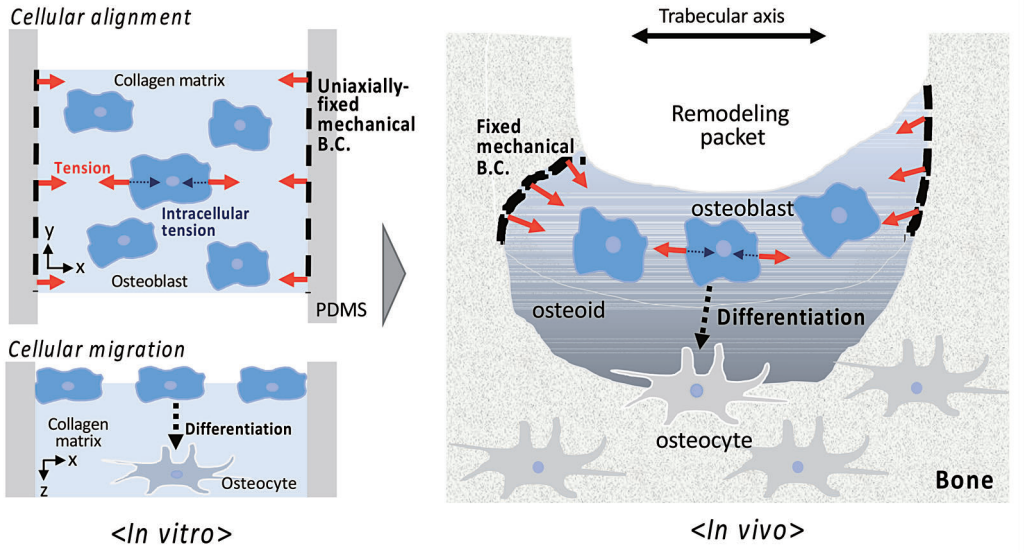


Fig. 2. Schematic diagram illustrating the significance of intracellular tension（left）and uniaxially fixed boundary condition in the bone matrix（right）to understand the formation process of in vivo osteocyte network.（Kim et al., 2021）

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 2021, using high-resolution image-based simulation, we revealed that membrane strain concentration on osteocyte processes was caused by the ultrastructure of osteocytes. In addition, we showed that intracellular tension of osteoblasts under uniaxially fixed boundary condition in collagen matrix elicited osteocyte alignment with induction of osteogenesis.

1）High-resolution image-based simulation revealing membrane strain concentration on osteocyte processes

Bone remodeling is regulated by osteocytes, which sense flow-induced mechanical stimuli applied to their cell processes. In the osteocyte mechanosensing mechanism, tethering elements（TEs）connecting the osteocyte process with the canalicular wall, as well as the irregular shapes of the osteocyte processes and the canaliculi, are thought to considerably influence the mechanical stimuli applied to the osteocytes. This study aims to clarify the roles of the ultrastructure of osteocyte processes and canaliculi in the mechanism of osteocyte mechanosensing. We constructed a high-resolution image-based model of an osteocyte process and a canaliculus based on ultra-high voltage electron microscope tomography and investigated the distribution and magnitude of flow-induced membrane strain on the osteocyte process through fluid–structure interaction simulation（Fig. 1）. The analysis showed that local strain concentration on the osteocyte process membrane was induced by a small number of TEs with high tension, which were inclined depending on the irregular shapes of osteocyte processes and canaliculi.

2）Uniaxially-fixed mechanical boundary condition elicits osteoblast- and osteocyte-like cellular alignment in collagen matrix

Osteocytes differentiated from osteoblasts perform an important function as mechanosensors in bone remodeling process. While it is understood that the well-aligned osteocyte network along the trabeculae with slender cell processes perpendicular to the trabeculae surface facilitates cellular sensing of mechanical stimuli and intracellular communication in the bone matrix, the mechanisms underlying the osteocyte network formation are unknown. In this study, we developed a new in vitro collagen matrix system exerting a uniaxially-fixed mechanical boundary condition on which mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells were subcultured（Fig. 2）. As a result, the cells provoked the cellular alignment along the uniaxially boundary condition. Using a myosin II inhibitor, blebbistatin, we showed that the intracellular tension via contraction of the actin fibers contributed to the cellular alignment under the influence of isometric matrix condition along the uniaxially-fixed boundary condition. Furthermore, with their orientations aligned along the uniaxially-fixed boundary condition, the cells actively moved inside the collagen matrix and exhibited enhanced gene expression of osteoblast and osteocyte markers. Therefore, our findings imply that one of the mechanisms determining osteocyte orientation inside the bone matrix is the intracellular tension of the cells under the uniaxially-fixed mechanical boundary condition.

List of Publications

1. 論文

Okeyo, K.O., Kibe, Y., Adachi, T.,（2021）. Controlling Macroscale Cell Alignment in Self-organized Cell Sheets by Tuning the Microstructure of Adhesion-limiting Micromesh Scaffolds. **Materials Today Advances**, *Vol. 12*, #100194.

Kim, J., Kigami, H., Adachi, T.（2021）. Comparative Gene Expression Analysis for Pre-osteoblast MC3T3-E1 Cells under Non-adhesive Culture toward Osteocyte Differentiation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, *Vol. 132*, No. 6, pp. 651-656.

Yokoyama, Y., Kameo, Y., Kamioka, H., Adachi, T.（2021）. High-resolution Image-based Simulation Reveals Membrane Strain Concentration on Osteocyte Processes Caused by Tethering Elements. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, *Vol. 20*, No. 6, pp. 2353-2360.

Kim, J., Adachi, T.（2021）. Modulation of Sost Gene Expression under Hypoxia in 3D Scaffold-free Osteocytic Tissue. **Tissue Engineering Part A**, *Vol. 15 & 16*, pp. 1037-1043.

Kim, J., Adachi, T.（2021）. Cell-fate Decision of Mesenchymal Stem Cells toward Osteocyte Differentiation is Committed by Spheroid Culture. **Scientific Reports**, *Vol. 11,* #13204.

Ando, Y., Okeyo, K.O., Sunaga, J., Adachi, T.（2021）. Edge-localized Alteration in Pluripotency State of Mouse ES cells Forming Topography-confined Layers on Designed Mesh Substrates. **Stem Cell**

Research, *Vol. 53*, #102352.

Kim, J., Ishikawa, K., Sunaga, J., Adachi, T.（2021）. Uniaxially-fixed Mechanical Boundary Condition Elicits Cellular Alignment in Collagen Matrix with Induction of Osteogenesis. **Scientific Reports**, *Vol. 11,* #9009.

Takeda, H., Kameo, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., Adachi, T.（2021）. Cerebellar Foliation via Non-uniform Cell Accumulation Caused by Fiber-guided Migration of Granular Cells. **Journal of Biomechanical Science and Engineering**, *Vol. 16*, No. 1, p.20-00515.

Nakao, N., Mori, I., Sunaga, J., Adachi, T.（2021）. Large Magnitude of Force Leads to NO-mediated Cell Shrinkage in Single Osteocytes Implying an Initial Apoptotic Response. **Journal of Biomechanics**, *Vol. 117*, #110245.

2. 書籍・総説等

仲尾信彦、安達泰治（2021）. 力学的過負荷に対する骨細胞の応答　2021-9、体育の科学、Vol. 71、No. 9、pp. 655-660.

亀尾佳貴、安達泰治（2021）. In silico 実験による代謝性骨疾患と薬物治療の探究 In Silico Experiments to Explore Metabolic Bone Diseases and their Drug Treatment　2021-6、生物物理、Vol. 61、No. 3、pp. 174-176.

List of Presentations

1. 講演・シンポジウム

Okeyo, K.O., Kawasaki, T., Kibe, Y., Adachi, T., Macroscale Level Control of Collective Cell Alignment by Tuning Stiffness Anisotropy. <Symposium> The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #SY4-05, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Okeyo, K.O., Enhancing the Differentiation Potential of Human iPS Cells by Modulating the Adhesion Microenvironment. <Invited> The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan（MBSJ2021）, Yokohama, Online, December 1-3, 2021.

安達泰治　生物の形態形成における力の役割：多階層バイオメカニクス.　九州大学先導物質化学研究所客員教授講演会、福岡、2021 年 11 月 17 日

Okeyo, K.O., Discerning the Differentiation Potential of Human Pluripotent Stem Cells by Modulating the Adhesion Microenvironment. <Invited> The 11th International Conference on Post-Genomic Technologies, China, Online, October 22-23, 2021.

安達泰治　多階層バイオメカニクスと骨代謝.　<Invited>　第 39 回日本骨代謝学会学術集会、シンポジウム：最新のテクノロジーが切り拓く骨代謝研究、神戸 Online、2021 年 10 月 8-10 日

金英寛　In silico 骨代謝シミュレーションと Wnt シグナル.　<Invited>　第 39 回日本骨代謝学会学術集会、シンポジウム：Wnt の基礎から応用まで：2021 Update、神戸 Online、2021 年 10 月 8-10 日

Adachi, T., In silico Experiments on Bone Adaptation by Remodeling. <Invited > International Conference of the Polish Society of Biomechanics（BIOMECHANICS2020）, Warsaw, Online, September 9-10, 2021.

牧功一郎　メカノセンサ分子・クロマチンの力学的構造変化.　日本機械学会 2021 年度年次大会、千葉 Online、2021 年 9 月 6 日

牧功一郎　原子間力顕微鏡により探るメカノセンサ 1 分子の力学挙動.　第 73 回細胞生物学会ランチョンセミナー（ブルカー）、京都 Online、2021 年 6 月 30 日

牧功一郎　静水圧作用下における軟骨細胞のクロマチンリモデリングが細胞周期に及ぼす効果.　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、東京 Online、2021 年 6 月 26 日

オケヨ・ケネディ、安藤悠太、安達泰治　Island 型メッシュ基板上でのマウス胚性幹細胞の自己組織化に伴う組織形態が局所的な未分化状態変化に及ぼす影響　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2C1-01、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

亀尾佳貴、宮雄貴、安達泰治　骨リモデリングの in silico 実験基盤開発と医療応用　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2B5-03、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

亀尾佳貴、竹田宏典、安達泰治　神経細胞の増殖と移動にともなう脳形態形成の数理モデリング Mathematical modeling of brain morphogenesis caused by neuronal proliferation and migration　第 60 回日本生体医工学会大会、SY3-2-1-6、京都、2021 年 6 月 15-17 日

2. 研究会・セミナー

オケヨ・ケネディ　微小培養環境制御に基づく幹細胞組織のメカノバイオロジー研究　AMED 革新的先端研究開発支援事業「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療器及び技術創出」令和 2 年度領域会議、東京 Online、2021 年 1 月 13-14 日

金英寛　細胞動態に基づく骨粗鬆症治療効果の in silico 解析　第 39 回バイオメカニクスセミナー、京都、2021 年 2 月 19 日

金英寛、田中栄、亀尾佳貴、安達泰治　骨粗鬆症治療による骨代謝調節機構の細胞動態に基づく数理解析　再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点 2020 年度報告会、京都、2021 年 3 月 19 日

仲尾信彦、森泉、須長純子、安達泰治　力学的過負荷に対する骨細胞の NO 応答とアポトーシスとの関連　再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点 2020 年度報告会、京都、2021 年 3 月 19 日

Okeyo, K.O., Kibe, Y., Kawasaki, T., Adachi, T. Cell Sheet Fabrication and Cell Alignment Control. 第 2 回

医薬系研究交流サロン , 京都 , 2021 年 4 月 19-21 日 .

オケヨ・ケネディ　細胞―基板間接着制限が誘導する自己組織化のメカノバイオロジー　第 22 回生命科学研究科シンポジウム、京都、2021 年 7 月 1-2 日

亀尾佳貴、数理モデル解析による組織形態形成の力学的解釈　第 22 回生命科学研究科シンポジウム、京都、2021 年 7 月 1-2 日

安達泰治　骨疾患評価に向けたバイオメカニクス応用：骨細胞突起の力感知　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 3 年度拠点運営会議、京都 Online、2021 年 9 月 3 日

安達泰治、亀尾佳貴、竹田宏典、山口嵩洋　多細胞ダイナミクスに基づく脳形態形成の数理モデル化とシミュレーション　文部科学省科学研究費補助金新学術領域「脳構築における発生時計と場の連携」第 6 回領域班会議、淡路、2021 年 12 月 9-11 日

3. 学会講演

Kim, J., Adachi, T., Three-dimensional Culture Technology: Self-organized Spheroid Culture Drives Osteocytogenesis. 2021 IEEE 3rd Global Conference on Life Sciences and Technologies (LifeTech), 東京 , Online, March 9-11, 2021.

Kim, J., Adachi, T., Mesenchymal Stem Cell Commitment to Osteocyte Differentiation is Facilitated in Spheroid Culture. 第 20 回日本再生医療学会総会 , 東京 , Online, March 11-13, 2021.

下平剛司、オケヨ・ケネディ、安達泰治　溝型デバイス上における細胞核変形に伴う YAP の細胞内分布観察　日本機械学会関西支部第 96 期定時総会講演会、#3805、大阪 Online、2021 年 3 月 17-18 日

キム・ジョンヒョン、安達泰治　3 次元スフェロイド培養による骨細胞分化誘導の研究　第 60 回日本生体医工学会大会、O2-8-2-3、京都、2021 年 6 月 15-17 日

Okeyo, K.O., Ando, Y., Adachi, T. Edge Tension Involvement in Pluripotency State Transition Determined Using Mouse ES Cell Layers　第 60 回日本生体医工学会大会、O1-8-1-4、京都、2021 年 6 月 15-17 日

神田英一郎、安達泰治、佐々木環、柏原直樹　CKD 進行と生命予後を精緻に予測する AI システムの開発　第 64 回日本腎臓学会学術総会、横浜 Online、2021 年 6 月 18-20 日

竹本祐也、牧功一郎、安達泰治　老化マウス骨組織における骨細胞・骨基質の形態イメージング　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#1S1-07、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

末竹崇志、牧功一郎、安達泰治　DNA 損傷応答における PAR 鎖の合成とクロマチン脱凝縮　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#1S1-19、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

山口大輝、牧功一郎、須長純子、安達泰治　コラーゲン埋没環境における骨芽細胞様細胞遊走の 3 次元イメージング　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#1S1-21、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治　生体組織の形態形成の理解に向けた連続体力学シミュレーション　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2A3-03、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

藤本航成、亀尾佳貴、安達泰治　骨損傷がリモデリングに及ぼす影響の数理モデル解析　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2S1-07、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

澤田剛、亀尾佳貴、安達泰治　海綿骨･皮質骨内膜面の in vivo 実験データに基づくリモデリングシミュレーション　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2S1-09、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

鈴木龍之介、亀尾佳貴、安達泰治　三次元斜交格子弾性体の Cosserat モデリング：海綿骨の力学モデル　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2S1-10、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

山口嵩洋、竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治　神経線維の配向による材料異方性を考慮した小脳しわ形成の有限要素解析　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2S1-12、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

福手淳平、牧功一郎、安達泰治　トポイソメラーゼ阻害による遺伝子転写の活性化　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2S1-16、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

キム・ジョンヒョン、安達泰治　骨芽細胞様細胞を用いた三次元構造体スフェロイドの骨細胞分化モデルへの応用　日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会、#2S1-33、東京 Online、2021 年 6 月 25-26 日

亀尾佳貴、坂野暢昭、安達泰治　皮質骨の多孔化にともなう海綿骨様組織形成の数理モデリング　第 41 回日本骨形態計測学会、Vol. 31、No. 2、p. S137、東京、2021 年 7 月 1-3 日

Kim, J., Ishikawa, K., Sunaga, J., Adachi, T. Intracellular Tension of Osteoblasts in Collagen Gel Elicits Osteocyte Alignment under Uniaxially-fixed Boundary Condition. The 2nd Joint Meeting of the European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, The International Society for Clinical Hemorheology, and The Internaitonal Society of Biorheology（ESCHM-ISCH-ISB 2021）, Fukuoka, Online, July 4-7, 2021.

Kim, J., Adachi, T., Pre-Osteoblast Cells in Three-dimensional Spheroid Exert Osteocyte-likeness. 26th Congress of the European Society of Biomechanics, #1258, Milan, Online, July 11-14, 2021.

Yokoyama, Y., Kameo, Y., Adachi, T. Image-based Analysis of Flow-induced Strain on the Osteocyte Process via Tethering Elements. 26th Congress of the European Society of Biomechanics, #1353, Milan, Online,

July 11-14, 2021.

Kameo, Y., Sakano, N., Adachi, T. Mathematical Modeling of Cortical to Cancellous Bone Transformation by Remodeling. 26th Congress of the European Society of Biomechanics, #1389, Milan, Online, July 11-14, 2021.

Kanda, E., Epureanu, B. I., Adachi, T., Sasaki, T., Kashihara, N., Usefulness of Machine-learning-predicted Probability as a New Risk Index for Prediction of Renal and Life Prognoses of Chronic Kidney Disease. Annual Meeting 2021 of the Society for Industrial and Applied Mathematics, US, Online, July 19-23, 2021.

Ando, Y., Okeyo, K.O., Sunaga, J., Adachi, T. Pluripotency State Alteration at the Tissue Edge of Morphologically Confined ES Layers Self-organized on Adhesion Limiting Substrate. MBI3M2021 Satellite Poster Session, Online, July 23, 2021.

Kameo, Y., Miya, Y., Adachi, T., In Silico Experiments of Bone Remodeling Towards Predicting Drug Treatment of Bone Diseases. 16th U.S. National Congress on Computational Mechanics（USNCCM16）, Chicago, Online, July 25-29, 2021.

オケヨ・ケネディ、玉井龍太郎、安達泰治　構成細胞間の接触を可能とする血液脳関門モデルの構築とそのバリア能評価　日本機械学会 2021 年度年次大会、#S021-03、千葉 Online、2021 年 9 月 6-8 日

キム・ジョンヒョン、安達泰治　3 次元骨細胞組織モデルを用いた細胞バイオメカニクス　日本機械学会 2021 年度年次大会、#S021-04、千葉 Online、2021 年 9 月 6-8 日

竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治　生体組織の成長により生じる分岐現象のエネルギー地形に基づく理解　日本機械学会 M&M2021 材料力学カンファレンス、OS1001、名古屋 Online、2021 年 9 月 15-16 日

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　細胞増殖による組織形態形成の力学モデル構築　日本機械学会 M&M2021 材料力学カンファレンス、OS1005、名古屋 Online、2021 年 9 月 15-16 日

Okeyo, K.O., Shimodaira, T., Adachi, T. YAP Distribution in Response to Nuclear Deformation Assessed Using an Open Channel Microdevice. The 25th International Systems for Chemistry and Life Sciences（Micro TAS 2021）, #M1C-115.a, Palm Spring, Online, October 10-14, 2021.

金英寛、亀尾佳貴、田中栄、安達泰治　破骨前駆細胞動態が骨粗鬆症における代謝回転に及ぼす影響の数理解析　第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会、2-8-37、伊勢 Online、2021 年 10 月 14-15 日

Kanda, E., Epureanu, B. I., Adachi, T., Sasaki, T., Kashihara, N., Usefulness of Machine-learning-predicted Probability as a New Risk Index for Prediction of Renal and Life Prognoses of Chronic Kidney Disease. ASN Kidney Week 2021（American Society of Nephrology）, San Diego, Online, November 4-7, 2021.

藤本航成、亀尾佳貴、安達泰治　リモデリングによる骨形態変化と骨損傷発展の連成数理モデル解析　第 48 回日本臨床バイオメカニクス学会、O5-2、pp. 101、宮崎 Online、2021 年 11 月 5-6 日

福田晃子、亀尾佳貴、安達泰治　力学刺激に応じた非石灰化・石灰化線維軟骨の分布を有する腱・靭帯付着部形成の数理モデリング　第 59 回日本生物物理学会年会、#1-14-1506、仙台 Online、2021 年 11 月 25-27 日

Fukute, J., Maki, K., Adachi, T. Exploring Mechanical Effects of DNA Twisting on RNA Polymerase II Activities. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #AB-02 oral, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Yamaguchi, T., Takeda, H., Kameo, Y., Adachi, T. Finite Element Analysis of Parallel Folding during Cerebellar Morphogenesis Considering Oriented Nerve Fibers. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP1-36 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Takemoto, Y., Maki, K., Adachi, T., Morphological Imaging of Osteocytes and Bone Matrix in Aged Murine Bone. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP1-45 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Sawada, T., Kameo, Y., Adachi, T. Remodeling Simulation of Cancellous Bone and Cortical Endosteal Surface Using in vivo μCT Image Data. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP1-46 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Suzuki, R., Kameo, Y., Adachi, T. Cosserat Modeling of Cancellous Bone as an Elastic Body with a Triclinic Lattice Structure. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP1-47 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Kim, J., Adachi, T. Differentiation Fate of Mesenchymal Stem Cells toward Osteocyte is Determined by Actin Balancing. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP1-116 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Fukute, J., Maki, K., Adachi, T. Exploring Mechanical Effects of DNA Twisting on RNA Polymerase II Activities. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-12 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Yamaguchi, H., Maki, K., Sunaga, J., Nakashima, T., Adachi, T. Analysis of Osteocytic Network Formation Focusing on Intercellular Communication via Cell Junctions between Osteocytes.
The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-13 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Kawasaki, T., Kibe, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T. Cell Alignment in Response to Substrate Stiffness Anisotropy Investigated Using Membrane-on-mesh Substrates. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-14 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Suetake, T., Maki, K., Adachi, T. Chromatin Unfolding and PAR Chain Synthesis in DNA Damage Response. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-15 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Fujimoto, K. Kameo, Y., Adachi, T. Computational Analysis of the Effects of Bone Microdamage on Bone Remodeling. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-45 poster, Kyoto Online, December 2-5, 2021.

Yokoyama, Y., Kameo, Y., Adachi, T. Computer Simulation of Multicellular Dynamics in Bone Morphogenesis by Material Point Method. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-102 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Fukuda, A., Kameo, Y., Adachi, T. Mathematical Modeling of Enthesis Formation in Response to Mechanical Loading. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-103 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

Kim, Y.K., Kameo, Y., Tanaka, S., Adachi, T. In Silico Investigation of Bone Turnover in Osteoporosis Based on Cell Population Dynamics. The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（APBiomech2021）, #PP2-109 poster, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

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**
助　教	**瀬戸　裕介**	**Assist. Prof.**	**Yusuke Seto**

脳や心臓等の器官形成過程は細胞の増殖、分化、移動など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、本分野では多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）を用いて in vivo での細胞分化誘導法および組織形成技術の開発を行うとともに、多様な細胞の分化プロセスとそれぞれが協調して機能的器官を作る分子機構を明らかとすることを目的として研究に取り組んでいる。本年度は、ヒト ES 細胞から神経堤細胞を誘導し、さらにそこから顔面組織を再構成する新規分化誘導法を確立した。また、ヒト ES 細胞から胚体外組織への運命転換に関する分子機構を明らかとした。

1）神経堤細胞から顔面組織の間葉への分化を再現する *in vitro* 分化系の確立

顔面組織のほとんどの領域は、胎児期に一過的に現れる神経堤細胞と呼ばれる幹細胞集団に由来する間葉系細胞によって形成される。この間葉系細胞の集団は将来の顔面組織となる咽頭弓の内部でパターニングされ、互いに異なる遺伝子群を発現するようになり、それぞれ異なる顔面領域へと寄与する。このパターニング過程の時空間的な制御機構には不明確な点が多く残されている。その研究の手段として、ヒト多能性幹細胞から神経堤細胞を経て、咽頭弓の間葉に類似した組織を誘導することができる新規の三次元分化系を確立した。この実験系においては、培養液中に特定のシグナル因子を添加することにより、上顎弓・下顎弓の作り分けが可能であった。また、誘導した組織の内部において、特定の遺伝子群が空間的に限局した発現パターンを示していることも確認できたことより、この分化系においては組織内で自発的に細胞集団のパターニングが起きていることが示唆された。本分化系を用いることにより、今後、ヒト顔面組織の初期のパターニング機構について解析が可能になるとともに、胎児期の異常に由来する頭部顔面の形性異常などについてもその機構や臨床的介入手段の探索が可能になるものと思われる。

2）ヒト ES 細胞から胚体外細胞系譜への運命転換の分子機構解析

ヒト ES 細胞は、着床期胚の多能性組織（エピブラスト）に相当する細胞状態であると考えられており、ヒト着床期の発生イベントを模倣する in vitro モデルとして期待されている。これまでに、胎児形成の原基となる三胚葉や生殖系列への運命決定の分子機構解析が精力的に進められており、その大枠が明らかとなりつつある。一方で、霊長類特有の発生現象として着床胚エピブラストから

の羊膜外胚葉という胚体外組織が出現することが知られているが、この霊長類特有の組織特性や発生メカニズムに関してはほとんど分かっていない。そこで、ヒト ES 細胞を胚体外組織へと誘導し、羊膜外胚葉の細胞特性や分化ポテンシャルに関する解析を行なった。まず、ES 細胞の培養環境を操作することで、細胞自律的に胚体外系譜へと運命転換を誘起する培養条件を見出した。そして、この ES 細胞由来胚体外細胞が、ヒト着床胚の羊膜外胚葉に相当する遺伝子発現パターンを示すことを証明した。また、この羊膜外胚葉細胞から栄養外胚葉細胞と羊膜細胞が出現することを示し、ヒト羊膜外胚葉が二つの胚体外組織の前駆細胞を含むという仮説を提案した。この研究成果は、未だ謎の多い霊長類着床期の細胞挙動について理解を深めるとともに、生殖補助医療技術の精度向上、不妊や胎児生育不全などの対症戦略へヒントを提供しうるものと期待できる。

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 established novel methodology to recapitulate craniofacial mesenchyme induction from neural crest cells. In addition, we also analyzed the molecular basis underlying the extraembryonic fate conversion of human ES cells.

1）Establishment of *in vitro* model of craniofacial mesenchyme induction from Neural crest cells

The most portion of craniofacial tissue is formed by the cluster of mesenchymal cells derived from transient embryonic cell population called neural crest cells. Those mesenchymal cells are patterned in the branchial arch, the future craniofacial tissue, to express distinct genes each other, and then contribute to different portion of craniofacial tissue. There are many unclear points about the mechanism of spatiotemporal regulation of this patterning in the craniofacial mesenchyme. As a tool to investigation, we established the novel three-dimensional culture model which can induce branchial arch-like mesenchymal cells from human pluripotent stem cells（hPSC）through neural crest cells. We could induce both maxillary arch-like mesenchyme and mandibular arch-like mesenchyme by adding specific signaling factors to culture medium. Furthermore, in the induced tissue, some genes were expressed in a spatially restricted manner indicating that spontaneous patterning had occurred inside the induced tissue. This new *in vitro* model would enable us to investigate the mechanism of early patterning of human craniofacial tissue. This model might be also beneficial for identifying the cause and the way for clinical intervention of congenital craniofacial abnormalities.

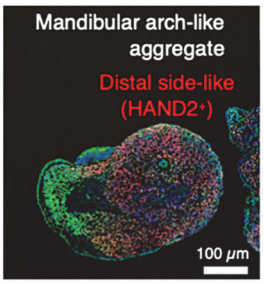


Fig.1. Mandibualar arch-like aggregates derived from hPSC

2）Induction of extraembryonic cells from human ES cells

Human ESCs are known to represent the primed state of pluripotency and to recapitulate the peri-implantation stage of human embryogenesis. In vitro differentiation systems using these cells have provided much insight into how the three germ layers are established from the pluripotent epiblast tissue; however, little has been known how the amniotic ectoderm, an extraembryonic tissue that shows unique properties to the primate, delaminate from the epiblast. To understand this, we developed an in vitro differentiation protocol to recapitulate human amniogenesis and elucidated the cytological features and differentiation potency of the ESC-derived nascent amnion-like cells. We showed that ESCs gave rise to the differentiated cells that were analogous to amniotic ectodermal cells of the post-implantation stage of the human embryo. We also showed that these nascent amnion-like cells produced not only matured amnion cells but also placental hormone-secreting syncytia that resemble trophectoderm-derived syncytiotrophoblasts of human embryos. These results will expand our understanding of the peri-implantation stage of human development, improve assisted reproductive technology and provide insight into how to treat development-associated disorders such as infertility and fetal growth retention.

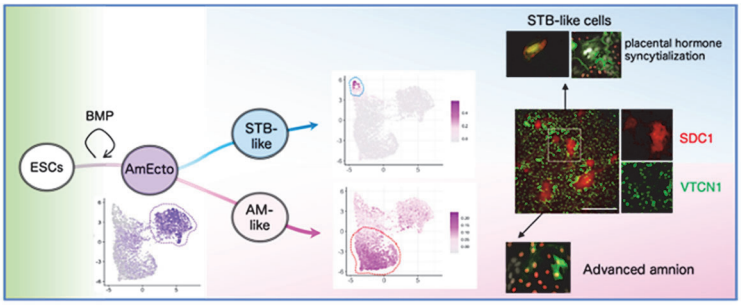


Fig.2. Extraembryonic lineages from human ESCs

List of Publications

Ikeya, M., Toyooka, Y., Eiraku, M.（2021）Pluripotent Stem Cells in Developmental Biology. **Dev Growth Differ**. 63;3-4.

List of Presentations

Eiraku, M. Challenges in Elucidating Life Phenomena by applying the Engineering-assisted Methods, The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Onsite（Yokohama）-Online, December 1-3, 2021

Eiraku, M. Functional tissue formation from pluripotent stem cells by multicellular autonomy. The 27th East Asia Joint Symposium. Web, October 27-29, 2021

永樂元次　多能性幹細胞からの機能的組織誘導　日本組織培養学会 第 93 回大会「技術が切り拓く多彩な未来 - 医療現場への道筋 -」、広島市 - ウェブ（ハイブリッド）開催、2021 年 9 月 2-3 日

永樂元次　幹細胞からの機能的組織誘導　基礎生物学研究所 2021 第三回再生学異分野融合研究会、ウェブ開催、2021 年 8 月 24-25 日

大串雅俊　Do human embryonic stem cells have trophoblast competence?　HIGO プログラム最先端研

究セミナー、熊本、2021 年 4 月 28 日

永樂元次　幹細胞からの多細胞組織形成と機能の創発　大隅基礎科学創成財団 第 6 回創発セミナー：再生の不思議と応用の可能性、ウェブ開催、2021 年 3 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**

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。薬学研究科の麻生と小杉は東京大学医科学研究所に国内留学している。古瀬は長崎大学附属病院に移籍した。2021 年には、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進めた。バンデンボンはバイオインフォマティクス解析手法の開発にあたっている。

1）n*ef* 遺伝子人工変異導入 HIV-1 によるウイルス感染臓器の追跡法（小柳）

ヒト免疫不全ウイルス -1 型（HIV-1）の CCR5 指向性株（JR-CSF）の *nef* 遺伝子にランダム突然変異誘発 PCR を使って変異させた感染性 JRCSF*ξnef* 変異プールウイルスを Jurkat-CCR5 細胞と造血幹細胞移植ヒト化マウスに感染させた。Jurkat-CCR5 細胞への感染実験で、このプールには複製能力のある多様な *nef* 配列を有するウイルスの存在が確認され、*nef* プールウイルスを感染後の血漿、および感染後 9 週目の剖検時にリンパ組織の *nef* 遺伝子配列をそれぞれ取得・比較した。すべてのマウスにおいて、骨髄および血漿が同一の *nef* 配列を保有し、骨髄がこれらのマウスにおいて血漿ウイルスの供給源として作用すること、脾臓と血漿の両方で同一の *nef* 配列も検出されることもあり、別のマウスではリンパ節と血漿で同一のウイルスが検出され、これらの組織も血漿ウイルスの供給源となることがわかった。一方、末梢血の DNA と同一の血漿ウイルスは見いだせなかった。*Nef* 遺伝子に人工的に変異させた HIV-1 を使ってその感染臓器を追跡することが可能であることがわかった。

2）さまざまなオミクスプラットフォームに基づいた遺伝子発現解析（Vandenbon）

Gene Expression Omnibus（GEO）や European Nucleotide Archive（ENA）などの公共データベースにある多数の RNA-seq データセットは、遺伝子機能と調節メカニズムを予測する上で非常に大きな可能性を秘めている。我々は、68 のヒトおよび 76 のマウス細胞種と組織を含む 8,796 および 12,114 の RNA-seq データに、50 の異なるデータ処理ワークフローを適用し、その包括的な評価を行った（Vandenbon, PLoS ONE, 2022）。どの処理ステップ（正規化とバッチ効果補正を含む）が高品質の遺伝子発現データをもたらすかを特定し、最適化された遺伝子発現データに基づいて、新しい遺伝子共発現データベースを準備している。

昨年度、1 細胞 RNA-seq データで特異的発現遺伝子を予測するための新しいアプローチを開発した（Vandenbon and Diez, Nature Communications, 2020）。現在、このアプローチをさらに改善し、例

えば 1 細胞 RNA-seq だけでなく、scATAC-seq や 10X Visium、Slide-seq V2、High-Definition Spatial Transcriptomics（HDST）、MERFISH などの空間転写データを含む他の種類のデータにも適用できるように拡張している（図 2）。我々の手法はこのようなデータの探索的分析に優れており、今後ともますます大きな役割を果たすと考える。

他の共同研究プロジェクトとして、マウス肝臓組織の 1 細胞 RNA-seq および空間転写データ、造血前駆細胞の scATAC-seq データ、200 万個の免疫細胞の表面タンパク質の Infinity Flow データなどの解析に貢献し、マクロファージの代謝制御における Cyclin J の役割を解析した（Chong et al., Science Signaling, 2022）。

In our laboratory, we are conducting research for the purpose of elucidating Virological and Immunological phenomena. Aso and Kosugi have been enrolled in the graduate program at the Graduate School of Pharmaceutical Sciences and are studying abroad at the Institute of Medical Science, the University of Tokyo. Furuse moved to Nagasaki University Hospital. Koyanagi is conducting research to clarify how HIV-1 establishes infection. Vandenbon is developing a bioinformatics analysis method for gene expression data.

1）HIV-1 tracing method of systemic viremia in vivo using an artificially mutated virus pool（Koyanagi）

We created JRCSFξnef, a pool of infectious HIV-1（strain JR-CSF）with highly mutated *nef* gene regions by random mutagenesis PCR and infected this mutated virus pool into both Jurkat-CCR5 cells and hematopoietic stem cell-transplanted humanized mice. In all mice, bone marrow and plasma have the same *nef* sequence, and bone marrow is the source of plasma virus in these mice. The same *nef* sequence is detected in both spleen and plasma, and another mouse with lymph nodes. From these observations, plasma virus is originated from these tissues. Infection resulted in systemic plasma viremia in humanized mice and viral RNA sequencing helped us to identify multiple lymphoid organs such as spleen, lymph nodes and bone marrow but not peripheral blood cells as the source of systemic viremia. Our data suggests that this method could be useful for the tracing of viral trafficking in vivo（Soper et al. Microbiol Immunol. 2021）.

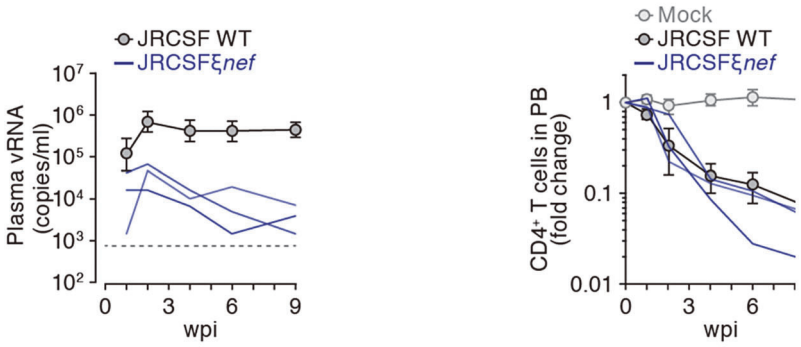


Fig. 1. Infection of JRCSFξnef virus pool in humanized mice.

（Left）The amounts of viral RNA in the mice infected with JRCSFζnef virus pool are indicated by lines, and the averages of viral RNA in WT JRCSF-infected mice are shown with SEM. Each dot indicates the result from individual infected mouse.（Right）The fold change of the level of peripheral $CD4^+$ T cells in the three mice infected with JRCSFζnef virus pool are indicated by lines, and the averages of the fold change of the level of peripheral $CD4^+$ T cells in WT JRCSF-infected mice and mock-infected mice are shown with SEM. Each dot indicates the result from each individual infected mouse.

2）Analysis of gene expression in various omics platforms（Vandenbon）

Large numbers of RNA-seq datasets in public databases such as the Gene Expression Omnibus（GEO）and the European Nucleotide Archive（ENA）contain a huge potential for computational prediction of gene functions and regulatory mechanisms. We have conducted a comprehensive evaluation of 50 different data processing workflows, applied on 8,796 and 12,114 RNA-seq samples covering 68 human and 76 mouse cell types and tissues（Vandenbon, PLoS ONE, 2022）. We identified which processing steps（including normalization and batch effect correction）result in high-quality gene expression data. We are also preparing a new gene co-expression database using the optimized gene expression data.

Recently we published a novel method for predicting differentially expressed genes in single-cell RNA-seq data（Vandenbon and Diez, Nature Communications, 2020）. We are now continuing the development of this method. For example, we are expanding the method so that it is now applicable not only on scRNA-seq, but also other types of data, including scATAC-seq and spatial transcriptomics data, including 10X Visium, Slide-seq V2, High-Definition Spatial Transcriptomics（HDST）, and MERFISH data（Fig.2）. Our method is promising for the exploratory analysis of such data, which will play an important role in the next years.

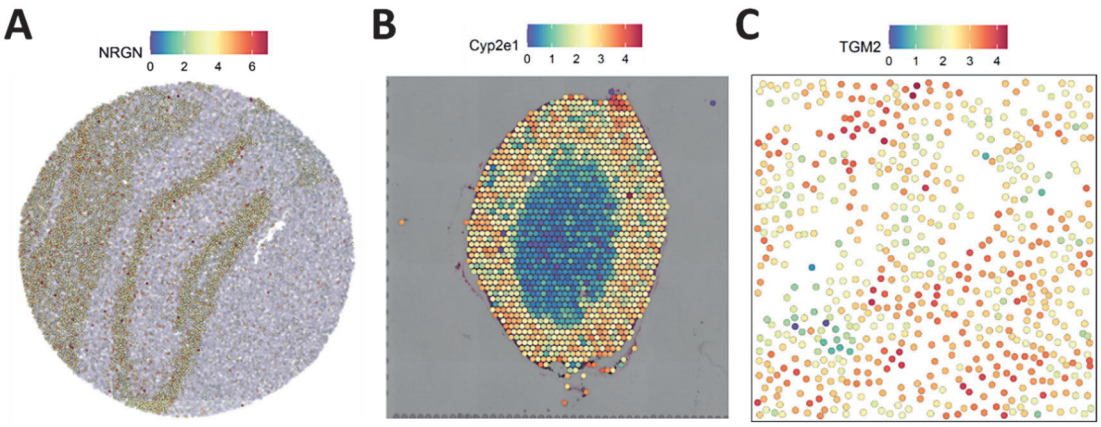


Fig. 2. General applicability of singleCellHaystack on data from different spatial transcriptomics platforms. Examples of genes with spatially variable expression as predicted using singleCellHaystack in（A）Slide-seq V2 data from mouse hippocampus（53,173 spots）,（B）10X Visium data from mouse kidney（1,438 spots）and（C）MERFISH data from human osteosarcoma cells（645 cells）. Each gene has high expression in parts of the tissue, and low expression in other parts.

In addition to the above bioinformatics-oriented project, we have been involved in multiple interdisciplinary collaborations, such as the analysis of single-cell RNA-seq and spatial transcriptomics data for mouse liver tissues, scATAC-seq data of early hematopoietic progenitor cells, and Infinity Flow data for hundreds of surface proteins on 2 million immune cells. We also analyzed the role of Cyclin J in controlling macrophage metabolism（Chong *et al.*, Science Signaling, 2022）.

List of Publications

Soper, A., Koyanagi, Y., Sato, K.（2021）HIV-1 tracing method of systemic viremia in vivo using an artificially mutated virus pool. **Microbiol Immunol.** 65（1）:17-27.

Matsui, H., Shirakawa, K., Konishi, Y., et al.（2021）CAGE-seq reveals that HIV-1 latent infection does not trigger unique cellular responses in a Jurkat T cell model. **J Virol.** 95（8）, e02394-20.

Kosugi, Y., Uriu, K., Suzuki, N., Yamamoto, K., Nagaoka, S., Kimura, I., Konno, Y., Aso, H., Willett, B.J., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., Ueda, M.T., Ito, J., Sato, K.（2021）A comprehensive investigation on the interplay between feline APOBEC3Z3 proteins and feline immunodeficiency virus Vif proteins. **J Virol.** 95（13）.

Kaku, Y., Kuwata, T., Md, Zahid, H., et al.（2021）Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by antibodies induced in convalescent patients with COVID-19. **Cell Reports,** 36（2）:109385.

Kumata, R., Iwanami, S., Mar, K.B., Kakizoe, Y., Misawa, N., Nakaoka, S., Koyanagi, Y., Perelson, A., Schoggins, J., Iwami, S., Sato, K.（2022）. Antithetic effect of interferon-α on cell-free and cell-to-cell HIV-1 infection. **PLOS Comput Bio** 18（4）, e1010053.

Vandenbon, A.（2022）. Evaluation of critical data processing steps for reliable prediction of gene co-expression from large collections of RNA-seq data. **PLoS ONE**. 17（1）, e0263344.

Chong, Y.K., Tartey, S., Yoshikawa, Y., Imami, K., Li, S., Yoshinaga, M., Hirabayashi, A., Liu, G., Vandenbon, A., Hia, F., Uehata, T., Mino, T., Suzuki, Y., Noda, T., Ferrandon, D., Standley, D.M., Ishihama, Y. and Takeuchi, O.（2022）. The Cyclin J-CDK complex regulates innate immune responses by controlling macrophage metabolism, **Science Signaling**. 15（729）, eabm5011.

List of Presentations

Vandenbon, A. SingleCellHaystack: A clustering-independent method for finding differentially expressed genes in single-cell transcriptome data. Tsukuba Bioinformatics Assembly（online）, 2021 年 10 月 21 日 .

Vandenbon, A. SingleCellHaystack: A clustering-independent method for finding differentially expressed genes in single-cell transcriptome data. 2021 年日本バイオインフォマティクス学会年会・第 10 回

生命医薬情報学連合大会 , (online), 2021 年 9 月 27-29 日 [Poster].

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**

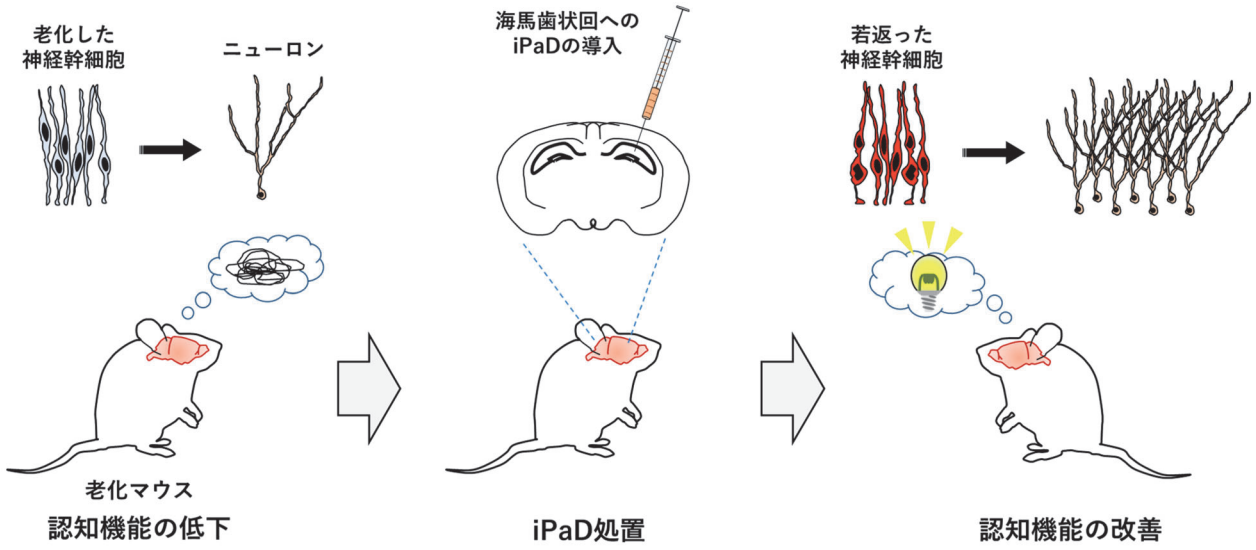
本分野は、2021 年 1 月～ 3 月まで増殖制御システム分野として活動後、影山龍一郎と磯村彰宏は 2021 年 4 月より生体物性学分野として活動した。一方、小林妙子は 2021 年 7 月 1 日より生命科学研究科へ異動し、大塚俊之は 2021 年 9 月 30 日に退職した。本分野では、神経幹細胞の新たな操作技術を開発した。成体脳の海馬歯状回に存在する神経幹細胞は静止状態にあるが、時折活性化して増殖し、新たなニューロンを生み出す。この新生ニューロンは、学習や記憶に重要な役割を持つ。しかし、加齢とともに神経幹細胞は活性化状態になる頻度が減少するため、ニューロンがあまり新生されなくなり、認知機能の低下を引き起こす。今回、胎生期に高発現する遺伝子 Plagl2 を強制発現し、老齢期で高発現する遺伝子 Dyrk1a をノックダウンする組み合わせよって、老化神経幹細胞を若返らせて効率よく活性化できることがわかった。その結果、老化マウスの認知機能が改善された。

老化神経幹細胞の若返りによるニューロン産生の復活と認知機能の改善

神経細胞（ニューロン）の元となる神経幹細胞は成体脳にも存在するが、胎生期とは異なり、増殖能やニューロン産生能は低下する。成体脳の神経幹細胞はある程度増えてニューロンを産生し、これらのニューロンは記憶や学習に重要な役割を果たす。しかし、老化とともに神経幹細胞は増殖能やニューロン産生能をほぼ完全に失ってしまい、その結果、認知機能が低下する。このような老化状態の神経幹細胞を若返らせて増殖能やニューロン産生能を復活させることが可能かどうかは明らかになっていなかった。

本研究において、胎生期に高発現する遺伝子を強制発現あるいは老齢期で高発現する遺伝子をノックダウンすることによって成体脳に内在する神経幹細胞の若返りが可能かどうか調べたところ、亜鉛フィンガータンパク質 Plagl2 の強制発現とダウン症候群関連キナーゼ Dyrk1a のノックダウンの組み合わせ（inducing Plagl2 and anti-Dyrk1a = iPaD）で老化神経幹細胞を効率よく若返らせることに成功した。若返った神経幹細胞は少なくとも 3 ヶ月以上の間増え続けて多数のニューロンを産生すること、その結果、老化マウスの認知機能が改善することが明らかになった。老化とともにクロマチン構造が変化して胎生期に働く遺伝子は発現が低下し、逆に老齢期で働く遺伝子は発現が増加するが、iPaD によってこれらの現象が逆転した。この成果は、認知症に対して、内在性神経幹

細胞の若返りによるニューロン補充療法の開発に繋がると期待される。



iPaD 処理による老化神経幹細胞の若返りと認知機能の改善

Functional rejuvenation of aged neural stem cells by Plagl2 and anti-Dyrk1a activity

The regenerative potential of neural stem cells（NSCs）declines during aging, leading to cognitive dysfunctions. This decline involves up-regulation of senescence-associated genes, but inactivation of such genes failed to reverse aging of hippocampal NSCs. Because many genes are up-regulated or down-regulated during aging, manipulation of single genes would be insufficient to reverse aging. Here we searched for a gene combination that can rejuvenate NSCs in the aged mouse brain from nuclear factors differentially expressed between embryonic and adult NSCs and their modulators. We found that a combination of inducing the zinc finger transcription factor gene *Plagl2* and inhibiting *Dyrk1a*, a gene associated with Down syndrome（a genetic disorder known to accelerate aging）, rejuvenated aged hippocampal NSCs, which already lost proliferative and neurogenic potential. Such rejuvenated NSCs proliferated and produced new neurons continuously at the level observed in juvenile hippocampi, leading to improved cognition. Epigenome, transcriptome, and live-imaging analyses indicated that this gene combination induces up-regulation of embryo-associated genes and down-regulation of age-associated genes by changing their chromatin accessibility, thereby rejuvenating aged dormant NSCs to function like juvenile active NSCs. Thus, aging of NSCs can be reversed to induce functional neurogenesis continuously, offering a way to treat age-related neurological disorders.

List of Publications

Glaser, T., Shimojo, H., Ribeiro, D.E., Martins, P.P.L., Beco, R.P., Kosinski, M., Sampaio, V.F.A., Corrêa-Velloso, J., Oliveira-Giacomelli, Á., Lameu, C., de Jesus Santos, A.P., de Souza, H.D.N., Teng, Y.D.,

Kageyama, R., and Ulrich, H.（2021）ATP and spontaneous calcium oscillation control neural stem cell fate determination in Huntington's disease: a novel approach for cell clock research. **Mol. Psychiatry** 26, 2633-2650.

Yoshioka-Kobayashi, K., and Kageyama, R.（2021）Imaging and manipulating the segmentation clock. **Cell. Mol. Life Sci.** 78, 1221-1231.

Ohtsuka, T., and Kageyama, R.（2021）Hes1 overexpression leads to expansion of neural stem cell reservoir and enhanced neurogenesis in the postnatal brain. **Development** 148, dev189191.

Zhang, Y., Lahmann, I., Baum, K., Shimojo, H., Mourikis, P., Wolf, J., Kageyama, R., and Birchmeier, C.（2021）Oscillations of Delta-like1 regulate the balance between differentiation and maintenance of muscle stem cells. **Nat. Commun.** 12, 1318.

Kobayashi, T., and Kageyama, R.（2021）Lysosomes and signaling pathways for maintenance of quiescence in adult neural stem cells. **FEBS J.** 288, 3082-3093.

Kaise, T., and Kageyama, R.（2021）Hes1 oscillation frequency correlates with activation of neural stem cells. **Gene Expression Patterns** 40, 119170.

Shqirat, M., Kinoshita, A., Kageyama, R., and Ohtsuka, T.（2021）Sonic hedgehog expands neural stem cells in the neocortical region leading to an expanded and wrinkled neocortical surface. **Genes Cells** 26, 399-410.

Kuriyama, K., Kodama, Y., Shiokawa, M., Nishikawa, Y., Marui, S., Kuwada, T., Sogabe, Y., Kakiuchi, N., Tomono, T., Matsumori, T., Mima, A., Morita, T., Ueda, T., Tsuda, M., Yamauchi, Y., Sakuma, Y., Ota, Y., Maruno, T., Uza, N., Kageyama, R., Chiba, T., and Seno, H.（2021）Essential role of Notch signaling in postnatal pancreatic exocrine development. **J. Gastroenterol.** 56, 673-687.

Sueda, R., and Kageyama, R.（2021）Oscillatory expression of *Ascl1* in oligodendrogenesis. **Gene Expression Patterns** 41, 119198.

Zhang, J., Uchiyama, J., Imami, K., Ishihama, Y., Kageyama, R., and Kobayashi, T.（2021）Novel roles of small extracellular vesicles in regulating the quiescence and proliferation of neural stem cells. **Front. Cell Dev. Biol.** 9, 762293.

Harada, Y., Yamada, M., Imayoshi, I., Kageyama, R., Furutachi, S., Kawaguchi, D., and Gotoh, Y.（2021）Cell cycle arrest determines adult neural stem cell ontogeny by an embryonic Notch-nonoscillatory *Hey1* module. **Nat. Commun.** 12, 6562.

Ohtsuka, T., and Kageyama, R.（2021）Dual activation of Shh and Notch signaling induces dramatic enlargement of neocortical surface area. **Neurosci. Res.** in press.

Kaise, T., Fukui, M., Sueda, R., Piao, W., Yamada, M., Kobayashi, T., Imayoshi, I., and Kageyama, R.（2021）Functional rejuvenation of aged neural stem cells by Plagl2 and anti-Dyrk1a activity. **Genes Dev.** in

press.

List of Presentations

Kageyama R. Timing mechanism of neural development. 85th Cold Spring Harbor Laboratory Symposium “Biological Time Keeping”, Cold Spring Harbor, USA, June 1-5, 2021.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control of active versus quiescent neural stem cells. Tohoku Univ, July 12, 2021.

Kageyama R. Dynamic control of neural stem cells in the adult brain. ABC-RI International Forum-Neuroscience in Health and Disease, Lisbon, Portugal, November 2, 2021.

Kageyama R. Dynamic control of neural stem cells. ASHBi Symposium, Kyoto, November 8-10, 2021.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control regulates active versus quiescent neural stem cells. The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences, Kumamoto, November 11-12, 2021.

吉岡久美子 . 分節時計における同期振動の分子機構 . 第 73 回日本細胞生物学会大会 , 2021 年 6 月 29 日.

影山龍一郎 . 神経幹細胞のダイナミックな制御とニューロン新生 . 同志社大学大学院脳科学研究科リトリート , 2021 年 9 月 3 日.

Maeda Y, Isomura A, Kageyama R. Hes1 expression dynamics-dependent control of cell cycle progression. 第 44 回日本分子生物学会年会 , 横浜 , 2021 年 12 月 1-3 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

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。本年は以下のような成果が得られた。

1）U snRNA の新生転写産物を不安定化する因子の同定

一次 RNA 転写産物は様々な方法で加工されて成熟した機能形態となる。例えば、ヒトのスプライソソーム U snRNA は TOE1 と呼ばれるエキソヌクレアーゼによって 3' 末端で成熟化される。TOE1 遺伝子の変異はヒトの遺伝病である先小脳低形成症（PCH）を引き起こす可能性があるため、この過程は重要である。しかし、細胞内で U snRNA を成熟させるエキソヌクレアーゼは TOE1 だけではない可能性がある。そこで、U1 snRNA の 3' 末端成熟を再現する in vitro 系を開発し、成熟化因子を生化学的に探索した。その結果、インターフェロン刺激遺伝子 20kDa タンパク質（ISG20）と核内エキソソームを候補として同定した。しかし、ノックダウン細胞の U1 snRNA の 3' 末端配列を網羅的に解析した結果、これらの因子は成熟因子そのものではないことがわかった。その代わりに、U snRNA や不安定な U1 バリアントの転写産物が、これらの因子のノックダウンにより増加することが明らかになった。以上の結果は、ISG20 と核内エキソソームが U snRNA と U1 バリアントの分解を促進することにより、新たに合成された U snRNA の品質管理することを示唆する。

2）真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子

真核生物のリボソームは約 80 個のリボソームタンパク質と 4 本の rRNA から構成される巨大な複合体である。ペプチジル基転移反応（PTC）をはじめ、リボソームの触媒活性には rRNA が重要な役割を果たしており、rRNA の重要塩基のひとつに点変異を導入するだけでリボソームの機能は失われてしまう。真核生物は、このような機能不全リボソームを選択的に認識して分解する品質管理機構をそなえている。われわれは、機能不全リボソームは分解前に Mms1 を含む複合体によりユビキチン化されることを明らかにしたが、この E3 複合体がリボソーム上の何を目印にして機能不全粒子を見分けているのかという点については、長い間未知のままであった。最近になってわれわれは機能不全リボソームの識別機構に Bec1 と名付けた因子が関与していることを見出した。この因子は機能不全 rRNA の発現により誘導されるユビキチン化に必須であり、正常リボソームよりも機能不全リボソームにより高い親和性をもって結合する。リボソーム上での結合部位を紫外線クロ

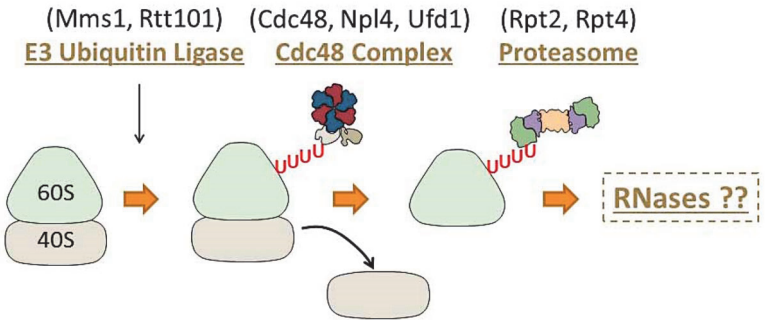


Fig.1　Model of 25S non-functional rRNA decay (NRD)

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を用いた in vitro ユビキチン化反応の構築を試み、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. Laboratory of RNA system is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on “RNA” as a key molecule.

1）Identification of factors that destabilize nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs

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 because 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 knockdown（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）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

Kawamoto T, Yoshimoto R, Taniguchi I, Kitabatake M, Ohno M.（2021）. ISG20 and nuclear exosome promote destabilization of nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs and U1 variants. **Genes Cells**. 26（1）:18-30.

List of Presentations

北畠真　出芽酵母のリボソーム合成経路における品質管理　酵母研究会第 88 回講演会、オンライン、2021 年 3 月 5 日

谷口一郎　RNA- タンパク質複合体の再編成を駆動する RNA ヘリカーゼの網羅的同定方法の開発　2021 酵素研究発表会、オンデマンド配信、2021 年 12 月 17-2022 年 1 月 5 日

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

生体膜システム分野
Laboratory of Biological Membrane System

教　授	秋山　芳展	Prof.	Yoshinori Akiyama
准教授	森　博幸	Assoc. Prof.	Hiroyuki Mori
助　教	檜作　洋平	Assist. Prof.	Yohei Hizukuri

本研究室では、大腸菌や海洋性ビブリオ菌等の細菌における細胞表層タンパク質の、折りたたみ、膜透過（分泌）、膜組み込み、局在化、分解、ストレス応答、及び、翻訳伸長の一時停止を介した遺伝子発現調節などの諸過程が、機能的ネットワークを形成し的確に起こるために細胞に備えられている仕組みを解析し、細菌細胞表層タンパク質の機能発現と秩序維持機構を明らかにしようと努めています。2021 年は、大腸菌の S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の構造と機能についての解析をおこない、RseP の膜表在性の両親媒性ヘリックス H1 が基質の選別と結合に関与することを示しました。また、RseP の新奇な基質として膜タンパク質 FecR を見出し、RseP が FecR の膜内切断を介して細胞の鉄取り込みに関わる事を明らかにしました。

1）大腸菌 S2P ペプチダーゼ RseP の基質選別及び基質結合における膜表在性の両親媒性ヘリックスの関与

膜内切断プロテアーゼは疎水的なリン脂質二重層内部で膜タンパク質を加水分解するユニークなプロテアーゼである。我々は、大腸菌の膜内切断プロテアーゼ RseP が、RseA の切断を介して σ^E 経路表層ストレス応答の活性化に関わることや、分泌タンパク質から切除されたシグナルペプチドを膜中で分解･除去することで膜の品質管理に働くことを示してきた。当研究室の先行研究において、RseP が持つペリプラズム領域のうち N 末端側に位置する 2 つの PDZ ドメインが、大きなペリプラズム領域を持つ膜タンパク質の切断を立体障害により防ぐサイズ排除フィルターとして機能することで基質選別を行うというモデルが提唱されている。一方で、RseP のペリプラズム領域の C 末端側領

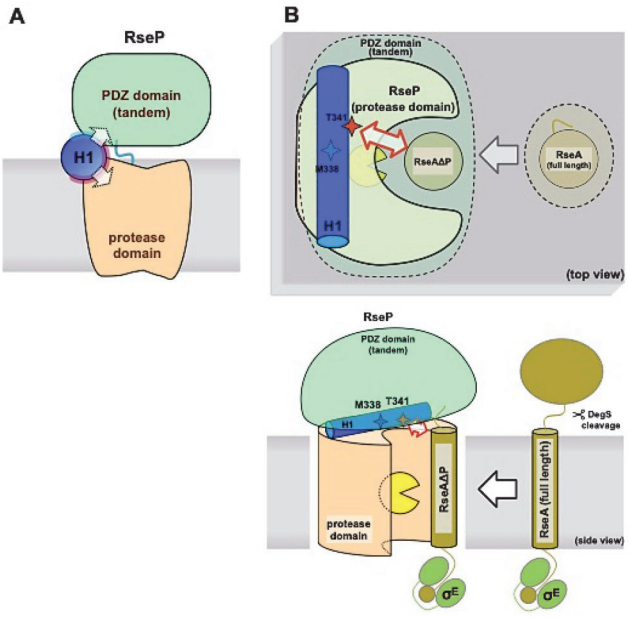


Fig.1 Functional models of H1 as (A) an intramolecular adapter, and (B) an intermolecular adapter.

域はその機能・構造が未知であった。我々はこの領域を PCT（PDZ Carboxyl Terminal）領域と命名し、解析を行った。大腸菌 RseP の PCT 領域は、強い両親媒性を示すと予測された特徴的なヘリックス領域（H1）を持っており、この特徴は PDZ ドメインを持つ細菌 S2P ファミリーペプチダーゼで共通していると予測された。そこで大腸菌 RseP において、膜不透過性チオール基特異的修飾試薬 AMS によりシステイン置換体の修飾解析を行ったところ、予測と合致して H1 領域は部分的に膜に埋もれた配向をとることが示唆された。また、H1 領域の欠損やプロリン変異導入により RseP の安定性や基質選別能、基質切断能が低下したことから、RseP の機能や構造安定性に H1 領域のヘリックス構造が重要である事が示唆された。さらに、H1 領域の系統的な *in vivo* 光架橋解析から、H1 と切断基質が直接相互作用することが示唆された。これらの結果から、H1 領域が、(i) 膜内部ペプチダーゼドメインと PDZ ドメインを繋ぎ適切な位置関係に保つことで RseP の安定性と正常な基質選別機能を維持する「分子内」アダプターとして働くとともに、(ii) 基質と相互作用して酵素 - 基質複合体を安定化することで基質切断に寄与する「分子間」アダプターとして機能するというモデルを提唱した（Fig.1）。

2）膜内切断プロテアーゼ RseP が切断する新奇基質 FecR の同定

RseP は表層ストレス応答の制御や膜の品質管理以外にも重要な生理機能を有していることが示唆されてきたものの、その実態は不明であった。そこで本研究では、京都大学薬学研究科の石濱泰博士らとの共同研究によりプロテオミクス解析を行い、RseP の切断基質を網羅的に探索することで、RseP の新たな生理機能を同定することを目的とした。その結果、*fecABCDE* オペロン（*fec* オペロン）にコードされているいくつかの Fec システムタンパク質の蓄積量が、RseP のプロテアーゼ機能欠損に伴って低下することを見出した。Fec システムは、クエン酸と錯体を形成した鉄イオン（ferric citrate）を細胞内に取り込む経路である。*fec* オペロンの転写は、転写調節因子である FecI と、その制御因子である一回膜貫通タンパク質 FecR によってコントロールされている。本研究で我々は、ferric citrate に依存した *fec* オペロンの転写活性化に RseP が必須であること、さらに FecR が RseP の生理的切断基質であることを明らかにした。また、FecR がシグナルに応じて膜上で連続的な切断を受けることも見出し、RseP がその最終ステップを担っていることを示した。さらに、RseP による切断を受けて膜から遊離した FecR の細胞質断片が、FecI を活性化するであろうことも明らかにした（Fig. 2.）。本研究は、FecR の切断を介して大腸菌の鉄取り込み経路を制御するという RseP の新たな生理機能を明らかにしたものである。Fec システムは、病原性大腸菌が尿路感染症や牛乳房炎を引き起こす上で重要な役割を担っている事が近年明らかにされつつある。本研究で得られた成果は、このような疾病の治療・予防薬の開発等に貢献できることが期待される。

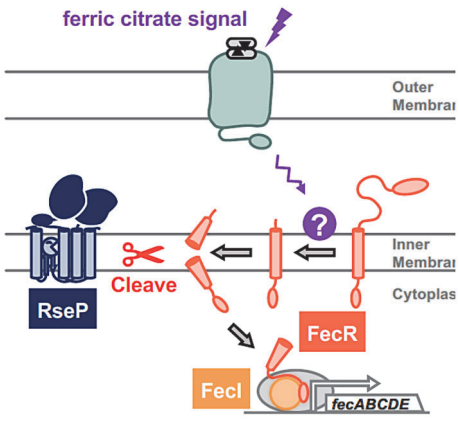


Fig. 2. RseP cleaves FecR to activate the transcription of the *fec* operon.

本年は、理学研究科修士課程大学院生として、小林達也さんと池田優希さんが新たに研究室に加わり、一方、宋　俊勇さんと艾　夢婷さんが同修士課程を修了して就職のために研究室を去りました。

The research projects carried out in this laboratory are concerned with dynamic aspects of cell surface proteins in bacteria including *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus*. Specifically, processes of protein folding, protein translocation across and integration into the membranes, membrane protein proteolysis, extracytoplasmic stress responses, and translational elongation arrest-mediated gene expression, are studied by combined molecular genetic, biochemical, biophysical, and structural approaches. In 2021, we conducted structural and functional analyses of RseP, the S2P family intramembrane protease of *E. coli*. We showed that a membrane-peripheral amphiphilic helix named H1 is involved in substrate discrimination and binding. We also identified FecR, a type II single-spanning membrane protein, as a novel substrate of RseP and revealed that RseP acts in the regulation of iron uptake by a cell via regulated intramembrane proteolysis of FecR.

1）Involvement of a membrane-bound amphiphilic helix in substrate discrimination and binding by an *Escherichia coli* S2P peptidase RseP

Intramembrane proteases are a group of unique proteases that hydrolyze membrane proteins within the hydrophobic phospholipid bilayer. RseP is one of the intramembrane proteases of *Escherichia coli*. RseP, an *E. coli* S2P family intramembrane peptidase. We have shown that RseP cleaves a membrane protein RseA to activate the σ^E pathway extracytoplasmic stress response, and remnant signal peptides to eliminate them from the cytoplasmic membrane. We previously proposed a model for substrate discrimination by RseP in which the two PDZ domains（PDZ tandem）in the N-terminal part of the central periplasmic region of RseP serve as a size-exclusion filter that prevents the access of substrates having a bulky periplasmic domain to the active site in the membrane-embedded RseP peptidase domain. However, the structure and function of the C-terminal part of a periplasmic domain of RseP, named the PCT（PDZ Carboxyl Terminal）region, are not known. It is predicted that the PCT region of *E. coli* RseP contains a characteristic region, named H1, that is predicted to assume an amphipathic helix. A similar H1-like region is commonly observed among bacterial S2P peptidases that have one or more PDZ domain(s). Our cysteine modifiability assay using membrane-impermeable thiol alkylating reagent AMS experimentally demonstrated that H1 indeed forms an amphipathic helix partially embedded in the membrane. Deletion of or proline substitutions in H1 destabilized RseP and compromised the ability of RseP to discriminate and proteolyze substrates, suggesting that the helical structure of H1 is important for both the function and stability of RseP. Systematic *in vivo* photo-cross-linking analysis suggested that H1 directly interacts with a substrate. Based on these results, we proposed the following models;（i）H1 acts as an 'intramolecular adapter' that connects the PDZ tandem and the intramembrane peptidase domain and keeps their proper arrangement, which is important for the stability and the normal substrate discrimination ability of RseP,（ii）H1 also acts as an 'intermolecular adapter' that

interacts with a substrate and stabilizes an enzyme-substrate complex.

2）Identification of a novel substrate and a physiological function of RseP.

As described above, RseP is involved in the regulation of a stress response and the quality control of the cytoplasmic membrane. Although it has been expected that RseP has additional physiological functions, no other substrate has been identified. We thus conducted mass spectrometry-based quantitative proteomic analysis to identify novel substrates in collaboration with Dr. Yasushi Ishihama's group at the Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University. We found that the accumulations of several Fec system proteins encoded by the *fecABCDE* operon（*fec* operon）were significantly decreased in RseP-deficient cells. The Fec system functions in iron uptake by *E. coli* cells; it catalyzes the import of ferric ion complexed with citric acid（ferric citrate）. The transcription of the *fec* operon genes is regulated by FecI, an alternative sigma factor, and its regulator FecR, a single-pass transmembrane protein. We demonstrated that RseP plays an essential for the ferric citrate-dependent transcriptional activation of the *fec* operon by directly cleaving FecR. We found that FecR receives sequential processing at the membrane. Our results indicate that RseP is responsible for the last step of the sequential processing and that the FecR cytoplasmic fragment generated by the RseP-catalyzed cleavage activates FecI. Our study unveiled a novel physiological role of RseP that is essential for the regulation of iron uptake through the intramembrane proteolysis of FecR.

List of Publications

Miyazaki, R., Watanabe, T., Yoshitani, K., and Akiyama, Y.（2021）. Edge strand of *Escherichia coli* BepA interacts with immature LptD on the *β*-barrel assembly machine to direct it to on- and off-pathways. **eLife** *10*, e70541.

Yokoyama, T., Niinae, T., Tsumagari, K., Imami, K., Ishihama, Y., Hizukuri, Y., and Akiyama, Y.（2021）. The *Escherichia coli* S2P intramembrane protease RseP regulates ferric citrate uptake by cleaving the sigma factor regulator FecR. **J. Biol. Chem.** *296*, 100673.

Tamura-Sakaguchi, R., Aruga, R., Hirose, M., Ekimoto, T., Miyake, T., Hizukuri, Y., Oi, R., Kaneko, M. M., Kato, Y., Akiyama, Y., Ikeguchi, M., Iwasaki, K., and Nogi, T.（2021）. Moving toward generalizable NZ-1 labeling for 3D structure determination with optimized epitope tag insertion. **Acta Crystallogr.** *D77,* 645-662.

宮﨑亮次、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 Presentation

檜作洋平　細菌膜内切断プロテアーゼの制御機構と生理機能　第 3 回生命理学研究会、名古屋、2021 年 3 月 13 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　大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の新奇生理機能：FecR の切断を介した鉄取り込みに関わる遺伝子群の転写活性化　日本農芸化学会 2021 年度大会、web 開催、2021 年 3 月 18–21 日

宮﨑亮次、渡邊哲朗、吉谷亘平、秋山芳展　大腸菌の外膜品質管理タンパク質 BepA の基質認識機構の解明　第 17 回 21 世紀大腸菌研究会、web 開催、2021 年 8 月 20 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　大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP は FecR を膜内で切断し、鉄取り込みに関わる遺伝子群の転写を制御する　第 17 回 21 世紀大腸菌研究会、web 開催、2021 年 8 月 20 日

艾　夢婷、宮﨑亮次、秋山芳展、森　博幸　部位特異的 *in vivo* 光架橋法によるタンパク質膜透過促進因子 SecD/F と膜結合型分子シャペロン PpiD/YfgM 複合体の相互作用解析　第 17 回 21 世紀大腸菌研究会、web 開催、2021 年 8 月 20 日

Yokoyama, T. The *Escherichia coli* intramembrane protease RseP regulates iron uptake by cleaving the sigma factor regulator FecR. The 27th East Asia Joint Symposium, web, October 27–29, 2021

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
助　教	一條　　遼	Assist. Prof.	Ryo Ichijo
特定助教	小林　芳彦	Project Assist. Prof.	Yoshihiko Kobayashi

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）妊娠における母体肝臓の胆管上皮細胞のダイナミクス解析

肝臓はエネルギーの生産、貯蔵、代謝、解毒、胆汁の生産等、多数の機能を持つ臓器である。これらの肝機能の大部分を担うのが肝臓の 70-80 % を占める上皮細胞である肝細胞である。肝臓の機能的構造単位は肝小葉と呼ばれる六角形の構造体であり、肝小葉の各頂点から門脈血と動脈血が流入し、中心静脈より流出する。一方、肝細胞で生産された胆汁は血液とは逆向きに流れ、胆管を通り胆のうで貯蔵される。肝細胞と胆管上皮細胞は発生中に現れる同一の細胞を起源としており、ともに肝臓の恒常性維持に必須である。

妊娠期には、母体の代謝変化に適応するため肝臓は肥大化する。妊娠期の肝臓肥大化には肝細胞の増殖と肥大化が伴うが、胆管上皮細胞の動態については不明である。本研究では、妊娠初期に胆管上皮細胞が一過的に増殖能力を獲得することを見出した。また、細胞系譜追跡実験の結果より、胆管上皮細胞は自己複製のみ行い、肝細胞への分化は生じないことが明らかとなった。さらに胆管上皮細胞の RNA-sequencing

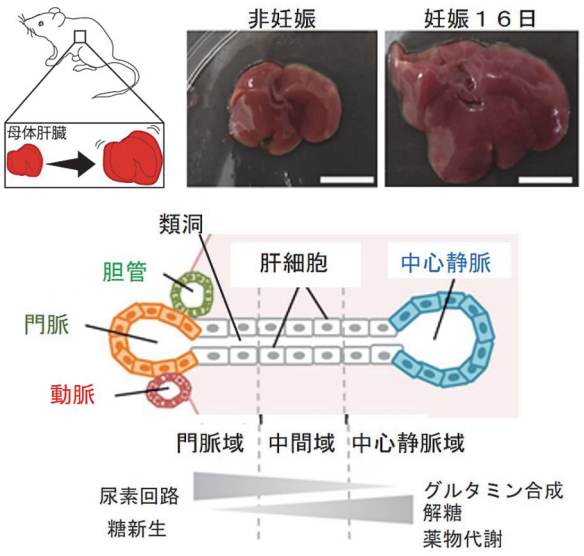


Fig. 1. Liver structure and remodeling during pregnancy

の結果より、妊娠初期の胆管上皮細胞では、YAP 関連遺伝子の発現が変動することが分かった。実際、妊娠期において胆管上皮細胞で YAP は核内移行し、YAP の機能阻害薬を妊娠マウスに投与すると胆管上皮細胞の増殖が抑制された。以上の結果より、妊娠初期において、胆管上皮細胞が YAP 依存的に増殖能を獲得することが明らかとなった。

2）上皮バリアを補強する生理活性ペプチド JIP の発見

上皮のバリア機能は、タイトジャンクション（TJ）注 1 と呼ばれる細胞間接着装置によって担われる。本研究では、マウス組織の分泌液の生化学的精製と質量分析解析により、TJ 形成を誘導する新規ペプチドを同定し、JIP（Junction-inducing peptide）と名付けた。JIP は、alpha1-antitrypsin の C 末端由来の 35-40 アミノ酸からなるペプチドであり、さまざまな培養上皮細胞を JIP で処理すると、TJ や TJ 様構造が形成されることを見出した。JIP は MMP によって全長 alpha1-antitrypsin から切り出されて産生され、炎症時・炎症回復時に発現が増加することが分かった。また、DSS 誘導性腸炎モデルマウスへの JIP 阻害抗体の投与実験から、JIP は炎症回復時の TJ バリア再構築に貢献することが示された。その作用機序に迫るため、培養上皮細胞への JIP 抗体の導入実験を行ったところ、JIP が細胞膜に刺さり、細胞質側に JIP の一部が露出していることが明らかになった。また、in vitroG13 活性化アッセイから、細胞質に存在する 3 量体 G タンパク質 G13 を直接活性化し、細胞間接着部位のアクチン骨格を再編成することで TJ の形成を誘導することが分かった。さらに、DSS 誘導性腸炎モデルマウスに JIP を投与したところ、DSS によって破綻した腸管バリア機能が回復して上皮のクリプト構造が維持され、体重減少や死亡率も抑制された。本研究により、JIP は TJ の形成を誘導することで損傷上皮組織の修復に貢献することが明らかとなり、バリア破綻を伴う病気に対する創薬シーズとして期待される。

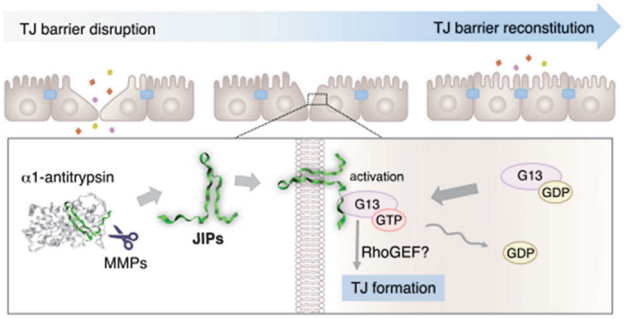


Fig. 2. JIP-inducing TJ formation

This laboratory aims to elucidate the mechanism of organ remodelling in response to physiological changes in the body. In particular, we focus on maternal organ remodelling during pregnancy from the perspectives of tissue stem cell dynamics, multicellular / multiorgan network, and mechanobiology. We aim to reveal the crosstalk between maternal body and fetus, and how the remodelling of maternal organs, such as abdominal skin and liver, contributes to the fetal growth. We also aim to apply the maternal remodeling mechanism to regenerative and anti-aging medicine.

1）Delineation of biliary epithelial cell dynamics in maternal liver during pregnancy

In pregnant mice, the maternal liver expands drastically during gestation, which is believed to be essential to accommodate various metabolic demands caused by physiological changes and fetal growth. Although hepatocyte proliferation and hypertrophy have been reported, little is known about the dynamics of biliary epithelial cells（BECs）, which comprise the bile duct epithelium in the liver. Here, we show that BECs transiently proliferate during the early stage of gestation. Lineage tracing revealed that BEC progeny were retained in the bile duct epithelium and did not differentiate into hepatocytes, indicating BEC self-replication during pregnancy. RNA-sequencing analysis of BECs identified their early pregnancy-signature transcriptomes, which highlighted Yes-associated protein（YAP）signaling-related genes. Nuclear accumulation of YAP was enhanced in BECs during pregnancy but was barely detectable in hepatocytes. In addition, the pharmacological inhibition of YAP attenuated BEC proliferation and liver weight gain during pregnancy. Our results delineate the proliferation and transcriptomic dynamics of BECs during pregnancy and suggest the relevance of YAP-mediated signals.

2）Discovery of anti-inflammatory physiological peptides that promote tissue-repair by reinforcing epithelial barrier formation

Epithelial barriers that prevent dehydration and pathogen invasion are established by tight junctions（TJs）, and their disruption leads to various inflammatory diseases and tissue destruction. However, a therapeutic strategy to overcome TJ disruption in diseases has not been established because of the lack of clinically applicable TJ-inducing molecules. Here, we discovered TJ-inducing peptides（JIPs）in mice and humans that corresponded to 35–42 residue peptides of the C-terminus of alpha 1-antitrypsin（A1AT）, an acute phase anti-inflammatory protein abundant in circulating blood. JIPs were inserted into the plasma membrane of epithelial cells, which promoted TJ formation by directly activating the heterotrimeric G protein G13. In a mouse intestinal epithelial injury model established by dextran sodium sulfate（DSS）, inhibition of JIPs impeded the restoration of TJs in regenerating intestinal epithelial cells, whereas mouse or human JIPs administration restored TJ integrity and strongly prevented colitis. Our study has revealed TJ-inducing anti-inflammatory physiological peptides that play a critical role in tissue repair and proposes a novel therapeutic strategy for TJ-disrupted diseases.

List of Publications

Kozuki S, Sakurai S, Suzuki A, Yamamoto T, Toyoshima F.（2021）. Delineation of biliary epithelial cell dynamics in maternal liver during pregnancy. **Genes Cells**. *27*, gtc.12918.

Oda Y, Takahashi C, Harada S, Nakamura S, Sun D, Kiso K, Urata Y, Miyachi H, Fujiyoshi Y, Honigmann A, Uchida S, Ishihama Y, Toyoshima F.（2021）. Discovery of anti-inflammatory physiological peptides that promote tissue-repair by reinforcing epithelial barrier formation. **Sci. Adv.** *7*, sciadv.abj6895.

Ichijo, R., Kabata, M., Kidoya, H., Muramatsu, F., Ishibashi, R., Abe, K., Tsutsui, K., Kubo, H., Iizuka, Y., Kitano, S., Miyachi, H., Fujiwara, H., Sada, A., Yamamoto, T., Toyoshima, F.（2021）. Vasculature-driven stem cell population coordinate tissue scaling in dynamic organs. **Sci. Adv.** *7*, sciadv.abd2575.

List of Presentations

Toyoshima, F. Skin remodeling during physiological body shape changes. Japan-Singapore Skin Webinar Series. Online, July 13, 2021.

Ryo Ichijo. Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs. 27st East-Asia Symposium, Online, October 28, 2021.

Yukako Oda, Chisato Takahashi, Shota Harada, Shun Nakamura, Daxiao Sun, Kazumi Kiso, Yuko Urata, Hitoshi Miyachi, Yoshinori Fujiyoshi, Alf Honigmann, Seiichi Uchida, Yasushi Ishihama, Fumiko Toyoshima. Anti-inflammatory peptides promote tissue-repair by reinforcing epithelial barrier. The 51st NIPS International Symposium, Online, December 7, 2021.

小田裕香子 細胞間接着を制御する新規ペプチドの同定と解析 第 60 回日本生体医工学会大会・第 36 回日本生体磁気学会大会、Web 開催、2021 年 6 月 16 日

小田裕香子・豊島文子 Novel peptides resolve inflammation and promote tissue-repair by inducing tight junction 第 73 回日本細胞生物学会大会 , Web 開催 , 2021 年 6 月 29 日

Toyoshima, F. Vascular-driven stem cell states coordinates tissue scaling in dynamic skin. 第 94 回日本生化学大会、Web 開催、2021 年 11 月 3-5 日

石橋理基、北野さつき、宮地均、豊島文子　汎用型ドナープラスミド pCriMGET を用いた CRISPR-Cas Gene Targeting システムの開発、Web 開催、2021 年 6 月 17-18 日

一條遼 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　第 73 回日本細胞生物学会大会、Web 開催、2021 年 6 月 29 日

上月智司　妊娠初期に増殖する肝細胞の機能解析　第 28 回肝細胞研究会、淡路夢舞台 /Web ハイブリッド開催、2021 年 9 月 10-11 日

石橋理基、北野さつき、宮地均、豊島文子 汎用型ドナープラスミド pCriMGET を用いた CRISPR-Cas Gene Targeting システムの開発、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜 /Web ハイブリッド開催、2021 年 11 月 30 日 -12 月 2 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。2021 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。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。また、理論生物学の教科書を執筆し出版した。

1）数理理論が予測した少数因子により、92 因子を含むホヤの遺伝子ネットワークを完全操作

様々な生命現象に多数種の生体分子が関わり、それらの相互作用がネットワークと呼ばれるほどに複雑であることが、分かってきている。複雑なシステム全体から生まれるダイナミクスこそが、生命機能の本質なのだと考えられている。これに対し我々は、システム全体のダイナミクスを捉え、操作するための鍵分子を、ネットワークの構造だけから決定する数理理論、リンケージロジックを開発してきた。この理論を用いて、ホヤの初期発生において、7 種の組織（表皮、脳、神経系、間充織、脊索、内胚葉、筋肉）の違い、すなわち細胞運命を司る遺伝子ネットワークを解析した結果、92 の因子を含む遺伝子調節ネットワークの振る舞いが、たった 5 つの因子（*Foxa.a*, *Foxd*, *Neurog*, *Zic-r.b*, Erk signaling）だけで、捉えられ制御できることが、予測された。つまり、ネットワーク情報が完全であるならば、これらの因子の活性操作だけで、ホヤの細胞運命を自由に制御できることになる。この予想に対する検証実験の結果、7 つの組織のうち、筋肉を除いた 6 種の細胞が、5 つの因子の活性操作により、自由に誘導できることが分かった。同時に、5 つの因子の網羅的操作によっ

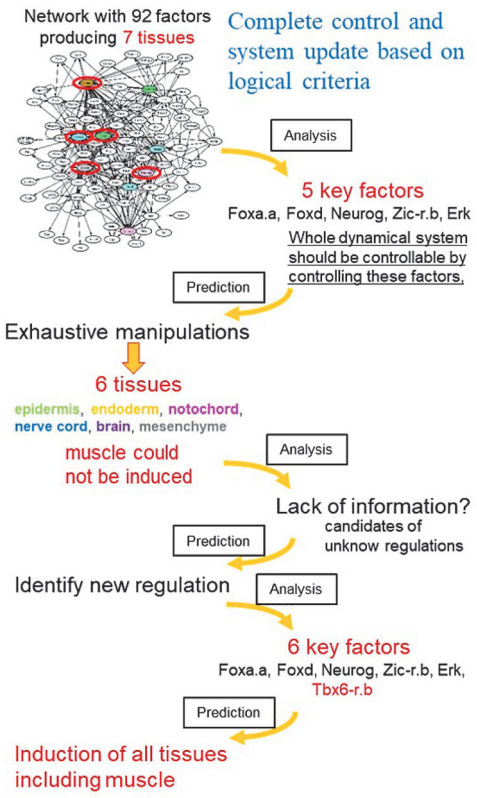


Fig. 1. Analysis of regulatory network of ascidian by Linkage logic.

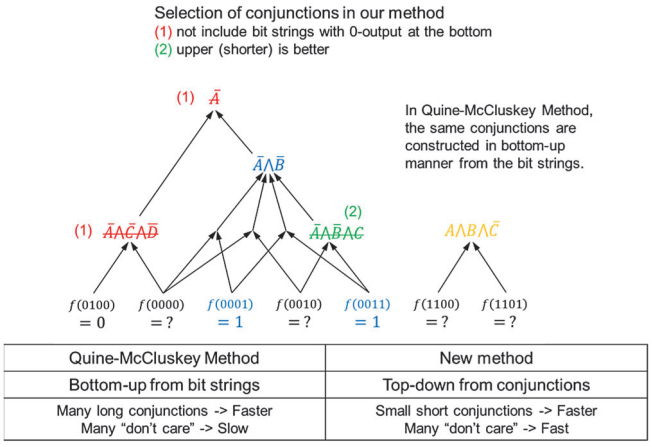
ても、筋肉だけが誘導できなかったことから、ネットワーク情報にわずかに欠落があることが予想され、課題として残されていた。

今回、リンケージロジックと発生遺伝学を組み合わせることで、ネットワーク情報の更新と、カタユウレイボヤの細胞運命の完全操作に成功した。まず、「遺伝子間制御が 1 つ加わることで理論が定める鍵分子が変わる」という基準で、未知の遺伝子間制御の候補をリストした。次に、リストされた遺伝子間制御を検討したところ、その中の一つが実際に働いていることが、分かった。新たな制御を加え、更新されたネットワークを解析したところ、鍵分子は 5 つではなく、6 つの因子（*Foxa.a*, *Foxd*, *Neurog*, *Zic-r.b*, Erk signaling, *Tbx6-r.b*）を含むことが示された。6 つの因子の活性を操作したところ、筋肉を含めた 7 つの組織を誘導することに成功した。

このように遺伝子の働きに関する生物学的知見を用いず、ネットワーク情報だけから鍵分子を決定し、生命システムの完全操作に成功した。ネットワーク情報の更新、という強い結果が得られたが、これはリンケージロジックが仮定を導入しないモデルフリー理論であることで可能となった。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）遺伝子発現パターンから遺伝子調節関数を予測する新規方法の開発

遺伝子発現パターンのリストから、ブール関数形式の下で、調節関数を推定する方法を開発し、ホヤの 32 細胞期に活性化する 13 個の遺伝子に適用した。これまでに明らかにされた遺伝子ネットワークにより、13 個の遺伝子のそれぞれについて、調節因子が同定されている。野生型および変異体で観察される各細胞における発現パターンから、調節因子の入力に対する各遺伝子の出力の情報が得られる。以下ではこれを真理値表 $T^n:\{0,1\}^{k_n} \to \{0,1\},\ (n = 1, \ldots, 13)$ と呼ぶ（ただし k_n は遺伝子 n を調節する因子の数）。真理値表が完全に与えられればブール関数表現は一意に決まるが、通常は真理値表の全ての要素を実験から与えることはできない。そこで「部分的に与えられた真理値表に対し、整合性のある最簡な積和標準形を求める」という問題を考える。この問題に対する従来の方法として、Quine–McCluskey 法が知られているが、この方法では探索数が大きすぎて、実用的時間で最簡形が決まらないことがある。そこで、新たな方法を開発した。すなわち、全ての可能なリテラルの論理積（A∧¬B 等）をリストした後、(i) 出力が 0 となるべき入力に対して出力が 1 となる論理積を除き、(ii) 出力が 1 となるべき入力のいずれに対しても出力が 0 となる論理積を除き、(iii) 残った論理積の可能な論理和の中から真理値表と一致し、最簡なものを選ぶ。この方法により、13 個全ての遺伝子について、調節関数を一意に決定することに成功した。得られた調節関数から、複数の遺伝子間で共通に用いられる論理積の存在が明らかとなった。これ



Quine-McCluskey Method	New method
Bottom-up from bit strings	Top-down from conjunctions
Many long conjunctions -> Faster Many “don’t care” -> Slow	Small short conjunctions -> Faster Many “don’t care” -> Fast

Fig. 2. Equivalence of Quine-McCluskey Method and New Method.

らの論理積は調節領域の制御モジュールに相当する可能性がある。

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）がん細胞における代謝リプログラミングの解明、(2）細胞周期の複数のチェックポイントが独立に制御される機構の解明、(3）植物導管の表層における自己組織的パターン形成、などを行った。

We study biological phenomena 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 2021 we accomplished a project of controlling cell-fate specification system by a small number of genes identified from information of a network by our theory. In addition, we have developed research using mathematical models for multiple biological phenomena. We also wrote and published a textbook on theoretical biology.

1）Complete control of a gene regulatory network of ascidian embryo by a few factors identified by a mathematical theory

We have many examples of large networks consisting of many species of bio-molecules and interactions between them. It is believed that the dynamics of molecular activities based on such networks are the origin of biological functions. To understand the dynamics of complex systems, we have developed Linkage Logic theory, by which key molecules to identify/control the dynamics of a whole system can be determined from information of the regulatory linkages alone. We have applied the theory to the gene regulatory network（GRN）for fate specification of seven tissues（epidermis, brain, nerve cord, endoderm, notochord, mesenchyme, muscle）in ascidian embryos. From the analysis we found that the dynamics of the network including more than 90 genes can be identified/controlled by only 5 genes（*Foxa.a*, *Foxd*, *Neurog*, *Zic-r.b*, Erk signaling）. This implies that cell fate of ascidian could be controllable just by manipulating activities of the 5 factors, if the information of the GRN is complete. We verified the prediction by combinatorial experiments of knockdown and overexpression, and obtained the results that six out of seven tissues except for muscle could be induced by manipulations of these 5 genes. These results, at the same time, suggested that the experimentally reconstituted GRN might be incomplete and lack information sufficient to reproduce muscle cells.

Here, we analyzed the GRN by combining linkage logic and experiments, and succeeded in updating the network system and to control the dynamics of the system completely. We utilized linkage logic theory as a tool to identify candidates of missing edges in the GRN. We found that one of the candidates does exist actually. From an updated version of the GRN, we identified 6 key factors（*Foxa.a*, *Foxd*, *Neurog*, *Zic-r.b*, Erk signaling, *Tbx6-r.b*）. Then, we confirmed that manipulating the activity of the 6 factors was sufficient to

induce all seven cell types（Fig. 1）.

In the study, the linkage logic provides two strong information:（1）a criterion to determine whether the network structure contains sufficient information to fulfil expected functions, and（2）candidate missing edges if the network information is not sufficient. We believe that our approach combining the linkage logic and experimental verification will promote understanding for many biological systems in life sciences.

2）Developing a new method for predicting gene regulatory functions from gene expression patterns

We developed a method to estimate the regulatory function from a list of gene expression patterns under the Boolean function, and applied it to 13 genes expressed in the 32-cell stage of ascidian. From the gene network identified previously, transcription factors for each of the 13 genes were identified. Expression patterns in each cell observed in wild-type and mutants provide information on the output of each gene for input of regulator expressions. In the following, this is called the truth table $T^n: \{0,1\}^{k_n} \to \{0,1\}$, $(n = 1, \ldots, 13)$（, where k_n is the number of regulator of gene n）. Given a complete truth table, the Boolean function representation is determined uniquely. However, it is usually impossible to obtain complete truth table from experimental observations. Therefore, we consider a problem of "finding a consistent and simplest *disjunctive normal form* for a partially given truth table." The Quine–McCluskey method is known as a conventional method for this problem, but this method may need too many searches to determine the simplest form in practical time. Therefore, we developed a new method. That is, after listing all conjunctions（A∧¬B, etc.）,（i）remove conjunctions whose output is 1 for any $\boldsymbol{s}$ such that $T^n(\boldsymbol{s}) = 0$,（ii）remove conjunctions whose output is 0 for all $\boldsymbol{s}$ such that $T^n(\boldsymbol{s}) = 1$,（iii）select the simplest one that matches the truth table from the possible logical sums of the remaining conjunctions. By this method, we succeeded in uniquely determining the regulatory functions for all 13 genes. From the obtained functions, we found that some conjunctions are used commonly among multiple genes. These common conjunctions may correspond to regulatory modules in *cis*-regulatory regions.（Fig. 2）.

3）Mathematical studies for biological phenomena

We studied some biological phenomena using mathematical modeling by collaborating experimental biologists. The projects include:（1）Studying metabolic reprogramming in cancer cells,（2）Studying a mechanism for the independent regulation of multiple checkpoints in the cell cycle,（3）Analyzing self-organizing pattern formations on the surface of vessel cells in plants by a reaction diffusion model.

List of Publications

Kobayashi K., Maeda K., Tokuoka M., Mochizuki A. and Satou Y.（2021）Using linkage logic theory to control dynamics of a gene regulatory network of a chordate embryo. *Sci. Rep.* **11**, 4001.

Tokuoka M., Maeda K., Kobayashi K., Mochizuki A. and Satou Y.（2021）The gene regulatory system for specifying germ layers in an early chordate embryo. *Sci. Adv.* **7**, eabf8210.

Mii Y., Nakazato K., Pack C. G., Ikeda T., Sako Y., Mochizuki A., Taira M. and Takada S.（2021）Quantitative analyses reveal extracellular dynamics of Wnt ligands in *Xenopus* embryos. *eLife* **10**, e55108.

Okada T., Mochizuki A., Furuta M., Tsai J-C..（2021）Flux-augmented bifurcation analysis in chemical reaction network systems. *Phys. Rev. E* **103**, 062212.

Akaki K., Ogata K., Yamauchi Y., Iwai No., Tse K. M., Hia F., Mochizuki A., Ishihama Y., Mino T., Takeuchi O.（2021）IRAK1-dependent Regnase-1-14-3-3 complex formation controls Regnase-1-mediated mRNA decay. *eLife* **10**, e71966.

望月敦史　*理論生物学概論* 2021 年 4 月刊行 共立出版 ISBN: 978-4-320-05830-9

望月敦史　「生命活動を生み出すネットワーク構造」*科学*（岩波書店）2021 年 91 巻 4 号 p348-351

望月敦史　「生命機能を生み出すネットワーク構造」　*医学のあゆみ* 2021 年 279 巻 3 号「今, 数理が面白い－医学・生物学への応用（渡邉昌俊 山口智彦 編）」205-211

List of Presentations

Mochizuki, A. "*Controlling cell fate specification system based on network structure*"（Plenary Speech）, DARS-SWARM2021, Online, June 1-4, 2021

望月敦史．招待講演「生命システムに対するモデルフリー理論　－細胞運命の操作と遺伝子制御の予測－」．京都大学サロン LHS, 京都大学（オンライン）, 2021 年 5 月 28 日

望月敦史．集中講義「生命のシステムの振る舞いをネットワーク構造だけから解明する」．明治非線形サマーセミナー , 明治大学（オンライン）, 2021 年 8 月 10-12 日

望月敦史．招待講演「遺伝子ネットワークの構造に基づく細胞運命の操作」．第 1 回 ASHBi 数理ヒト生物学研究会（MathHuB 研究会）, ヒト生物学高等研究拠点 , 2021 年 10 月 29 日

望月敦史．招待講演「生命のシステムの振る舞いをネットワーク構造だけから決定する」．武蔵野大学数理工学シンポジウム , 武蔵野大学有明キャンパス , 2021 年 11 月 16-17 日

望月敦史．招待講演「化学反応ネットワークの構造に基づく振る舞いの解析　－基礎から生命機能まで－」．開放系トポロジーの探求 , 京都大学基礎物理学研究所 , 2021 年 11 月 23-26 日

望月敦史．招待講演「生命のシステムの振る舞いをネットワーク構造だけから決定する」．第 35 回分子シミュレーション討論会 , 岡山大学 , 2021 年 11 月 29 日 -12 月 1 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 3 年目の本年度は、Shafiqul Islam さんが医学研究科医学専攻博士課程に入学したが、コロナ禍の影響で本年度中の来日ができず後期休学し、来年度の来日を目指すこととなった。Raghda Khatab さんは引き続き研究生として在籍し、医学研究科医科学専攻修士課程への進学が確定した。また、研究室スタッフとして、5 月より川村文彦特定助教が、本研究室での活動を開始した。

本年度は、当研究室で開発した CRISPR-KO スクリーニング法を使った国際共同研究において成果を収め、論文発表することができた。英国 Babraham 研究所の Peter Rugg-Gunn 博士の研究グループとの共同研究である。Peter Rugg-Gunn 博士は 2017 年に Cell Stem Cell 誌に発表した論文で、プライム型ヒト多能性幹細胞（通常のヒト ES/iPS 細胞）をより未分化なナイーブ型へとリプログラムする過程で変化する細胞表面タンパク質のプロファイルを取得し、両状態を明確に区別しうるマーカーを発見した。ナイーブ型多能性幹細胞はより未分化でありプライム型では失われた能力を有すると考えられており、近年注目をさらに集めている新しいタイプの多能性幹細胞である。ナイーブ型細胞は、通常、培養維持されているプライム型細胞に種々の阻害剤、サイトカインを添加してリプログラムさせるが、その過程に関わる遺伝子は未知であった。そこで共同研究を計画し、CRISPR-KO スクリーニングを用いてナイーブ型リプログラミングを亢進あるいは阻害する遺伝子の同定を試みた。その結果、負あるいは正に制御する複数の遺伝子候補を得ることができ、また確認実験においてもこれらの表現型を確認した。ナイーブ型リプログラミングに必須の遺伝子としてエピゲノム関連因子が多く見出され、特に複数存在するポリコーム複合体 1 のサブタイプのうち PRC1.3 がナイーブ型リプログラミングに必須の機能を担っており、PRC1.3 標的遺伝子の発現を抑制することによりナイーブ型リプログラミングを促進していることを明らかとした。また、ナイーブ型リプ

ログラミングを抑制的に制御する遺伝子として HDAC2 を見出し、この阻害剤をリプログラミングに加えることで、効率を 2 倍程度上昇させることにも成功した。さらに複数の未解析の遺伝子候補があるので、さらに研究を進めることで、ナイーブ型リプログラムの分子機構がより詳細に明らかになると期待される。

また、青木助教が筆頭著者の論文を発表した。ほぼ全ての血液細胞は造血幹細胞から生み出されており、造血幹細胞は骨髄においてニッシェと呼ばれる特別な微小環境において維持されている。近年の研究で、CXC chemokine ligand 12（CXCL12）-abundant reticular（CAR）細胞がマウス骨髄における造血幹細胞ニッシェの主要な構成要素であることが明らかになった。CAR 細胞は Leptin receptor（LEPR）発現細胞と概ね一致し、造血幹細胞の維持に必須の CXCL12、stem cell factor（SCF）、転写因子 forkhead box C1（FOXC1）と early B-cell factor 3（EBF3）を高発現するといった特性を持つ特殊な間葉系幹細胞である。一方、ヒト骨髄において CAR 細胞と同様の特性を持つ細胞が存在するか否かは不明であった。本研究では、1 細胞レベルで mRNA と蛋白質の発現を数百万個の細胞において同時に検出可能なフローサイトメトリー技術を用いることで、成人骨髄において *CXCL12* mRNA を著しく高発現する細胞が存在することを示した。*CXCL12*^{high} 細胞は LEPR^{+} 細胞と一致し、他の細胞と比較して *SCF*、*FOXC1*、及び *EBF3* mRNA を著しく高発現し、*in vitro* において脂肪細胞と骨芽細胞に分化する能力を有し、固定骨髄切片において EBF3 の発現により同定可能であった。これまで CD271 が骨髄間葉系細胞のマーカーとして使用されてきたが、CD271^{+} 細胞は *CXCL12*^{high} 細胞と *CXCL12*^{low} 骨芽細胞を含んでいた。骨髄増殖性疾患患者の余剰骨髄穿刺液から単離した LEPR^{+} 細胞の遺伝子発現を解析したところ、慢性骨髄性白血病患者の LEPR^{+} 細胞において *CXCL12*、*SCF*、*FOXC1*、及び *EBF3* mRNA の発現が腫瘍量と負に相関して有意に低下していることを見出した。このように、本研究は成人骨髄において CAR 細胞と同様の特性を持つ細胞が存在することを示し、様々な造血器疾患患者の CAR 細胞の変化をフローサイトメトリーや組織学的解析によって評価することを可能にした。

Our laboratory, Stem Cell Genetics, was 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 we 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.

In the Year 3 of our lab history, Mr. Shafiqul Islam, a PhD student who affiliates with Graduate School of Medicine, joined our laboratory. However, as the COVID-19 pandemic continued, he was not able to come to Japan during his first year and thus took a leave in the second semester. He is aiming to resume this study in

April 2022. Ms. Raghda Khatab continued her research student in 2021 and successfully passed the entrance exam for the Master course in Graduate School of Medicine. As a stuff member, Dr. Fumihiko Kawamura joined and started his work in our laboratory.

In this year, we published one of our international collaboration projects we contributed to with our CRISPR-KO screening technology（Collier et al.）. This collaboration was with Dr. Peter Rugg-Gunn at the Babraham Institute, Cambridge, UK. In a Cell Stem Cell paper published in 2017, his group identified a series of cell surface proteins that can faithfully distinguish the two pluripotent states, namely naïve and primed pluripotency. Routinely cultured human pluripotent stem cells（PSCs）are in the state called primed pluripotency. These cells are known to be reprogrammed with an appropriate cocktail of inhibitors and cytokines into a more immature state, termed naïve pluripotency, which corresponds an earlier stage of human development. However, the molecular basis of naïve reprogramming has not been well understood. In our collaboration, we sought to identify genes involved in naïve reprogramming with CRISPR-KO screening combined with the cell surface markers. We could identify a number of genes that when knocked out either enhance or inhibit reprogramming and found that these genes were enriched in epigenetic machinery. Among them, we focused our analysis on polycomb complex1.3（PRC1.3）and found that this complex suppresses their target genes during reprogramming and ensure that cells turn into the naïve state. HDAC2 showed an inhibitory effect on reprogramming. By adding HDAC2 inhibitors into the reprogramming cocktail, we could increase reprogramming efficiency by twofold. Since there are still genes that have not been analysed, further analyses would provide deeper insights into naïve reprograming and could provide novel ways to generate these interesting cell types.

In another published work, Dr. Aoki described human niches for hematopoietic stem cell（HSC）maintenance. Most blood cells are generated from HSCs, which are maintained by special microenvironments, known as niches, in bone marrow. Recent studies have demonstrated that CXC chemokine ligand 12（CXCL12）-abundant reticular（CAR）cells are the major component of HSC niches in murine bone marrow. CAR cells, which strongly overlap with leptin receptor（LEPR）-expressing cells, are the specialized mesenchymal stem cells characterized by several salient features, including high expression of CXCL12, stem cell factor（SCF）, the transcription factors forkhead box C1（FOXC1）and early B-cell factor 3（EBF3）, which are essential for the maintenance of HSCs. However, the human counterpart of CAR cells has not been fully described. In this study, we showed the presence of cells expressing much higher levels of *CXCL12* mRNA than other cells in human adult bone marrow using a flow cytometry-based *in-situ* technique that enables simultaneous detection of mRNAs and proteins within millions of cells at single-cell resolution. *CXCL12*^{high} cells strongly overlapped with LEPR^{+} cells, expressed much higher levels of *SCF*, *FOXC1* and *EBF3* mRNAs than other types of cells, had the potential to differentiate into adipocytes and osteoblasts *in vitro*, and were identified by EBF3 staining in human adult marrow sections. Although CD271 had been used as a marker for bone marrow mesenchymal stromal cells,

CD271^{+} cells contained *CXCL12*^{high} cells and *CXCL12*^{low} osteoblastic cells. We analyzed the gene expression of LEPR^{+} cells isolated from residual bone marrow aspirates of patients with myeloproliferative neoplasms and found that LEPR^{+} cells from chronic myeloid leukemia patients expressed reduced levels of *CXCL12*, *SCF*, *FOXC1*, and *EBF3* mRNAs in correlation with increased leukemic burden. Thus, we identified the human counterpart of CAR cells, enabling the evaluation of their alterations in patients with various hematological disorders by flow cytometric and histological analyses.

List of Publications

＜原著論文＞

Collier AJ, Bendall A, Fabian C, Malcolm AA, Tilgner K, Semprich CI, Wojdyla K, Nisi PS, Kishore K, Franklin VNR, Mirshekar-Syahkal B, D'Santos C, Plath K, **Yusa K**, Rugg-Gunn PJ. Genome-Wide Screening Identifies Polycomb Repressive Complex 1.3 as an Essential Regulator of Human Naïve Pluripotent Cell Reprogramming. **Sci Adv.** 2022 Mar 25;8（12）:eabk0013.

Hasegawa K, Ikeda S, Yaga M, Watanabe K, Urakawa R, Iehara A, Iwai M, Hashiguchi S, Morimoto S, Fujiki F, Nakajima H, Nakata J, Nishida S, Tsuboi A, Oka Y, Yoshihara S, Manabe M, Ichihara H, Mugitani A, Aoyama Y, Nakao T, Hirose A, Hino M, Ueda S, Takenaka K, Masuko T, Akashi K, Maruno T, Uchiyama S, Takamatsu S, Wada N, Morii E, Nagamori S, Motooka D, Kanai Y, Oji Y, Nakagawa T, Kijima N, Kishima H, Ikeda A, Ogino T, Shintani Y, Kubo T, Mihara E, **Yusa K**, Sugiyama H, Takagi J, Miyoshi E, Kumanogoh A, Hosen N. Selective targeting of multiple myeloma cells with a monoclonal antibody recognizing the ubiquitous protein CD98 heavy chain. **Sci. Transl. Med**. 2022 Feb 16;14（632）:eaax7706.

Lafage-Pochitaloff M, Gerby B, Baccini V, Largeaud L, Fregona V, Prade N, Juvin PY, Jamrog L, Bories P, Hébrard S, Lagarde S, Mansat-De Mas V, Dovey OM, **Yusa K**, Vassiliou GS, Jansen JH, Tekath T, Rombaut D, Ameye G, Barin C, Bidet A, Boudjarane J, Collonge-Rame MA, Gervais C, Ittel A, Lefebvre C, Luquet I, Michaux L, Nadal N, Poirel HA, Radford-Weiss I, Ribourtout B, Richebourg S, Struski S, Terré C, Tigaud I, Penther D, Eclache V, Fontenay M, Broccardo C, Delabesse E. The CADM1 tumor suppressor gene is a major candidate gene in MDS with deletion of the long arm of chromosome 11. **Blood Adv.** 2022 Jan 25;6（2）:386-398.

Suzuki T, Hayashi M, Komatsu T, Tanioka A, Nagasawa M, Tanimura-Inagaki K, Rahman MS, Masuda S, **Yusa K**, Sakai J, Shibata H, Inagaki T. Measurement of the nuclear concentration of α-ketoglutarate during adipocyte differentiation by using a fluorescence resonance energy transfer-based biosensor with nuclear localization signals. **Endocr. J.** 2021 Dec 28;68（12）:1429-1438.

Aoki K, Kurashige M, Ichii M, Higaki K, Sugiyama T, Kaito T, Ando W, Sugano N, Sakai T, Shibayama H; HANDAI Clinical Blood Club, Takaori-Kondo A, Morii E, Kanakura Y, Nagasawa T. Identification of CXCL12-abundant reticular cells in human adult bone marrow. **Br. J. Haematol.** 2021 May;193

（3）:659-668

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.** KAT7 is a genetic vulnerability of acute myeloid leukemias driven by MLL rearrangements. **Leukemia**. 2021 Apr;35（4）:1012-1022.

List of presentations

＜招待講演＞

遊佐宏介　CRISPR-KO スクリーニングによる多能性幹細胞の未分化維持機構の解明 第 110 回日本病理学会総会　東京（オンライン）　2021 年 4 月 22 日

遊佐宏介　CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用　生化学会北陸支部第 39 回大会　金沢医科大学（オンライン）　2021 年 6 月 5 日

遊佐宏介　CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用　第 73 回日本細胞生物学会大会　京都（オンライン）　2021 年 6 月 30 日

遊佐宏介　CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用　第 80 回日本癌学会学術総会　横浜（オンライン）　2021 年 10 月 2 日

Kosuke Yusa　Development and application of CRISPR-KO screening The 27th East Asia Joint Symposium University of Tokyo（Online）　27 October 2021

遊佐宏介　ヒト ES/iPS 細胞に蓄積される変異　第 1 回京都大学ウイルス･再生医科学研究所附属ヒト ES 細胞研究センターシンポジウム　2022 年 3 月 9 日

遊佐宏介　CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用　第 21 回日本再生医療学会総会　オンライン　2022 年 3 月 19 日

＜一般演題＞

Yusuke Tarumoto, Katarzyna Tilgner, Bahar Mirshekar, Yoshie Masuda, **Seiichi Sugino**, **Kosuke Yusa**. Transcriptional corepressor-mediated regulation in human pluripotent stem cells. 第 18 回幹細胞シンポジウム（オンライン）2021 年 5 月 21-22 日

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　顕教**	**Assist. Prof.**	**Kenkyo Matsuura**
助　教	**沖川沙佑美**	**Assist. Prof.**	**Sayumi Okigawa**

がん・幹細胞シグナル分野では、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。ラボ開設2年目を迎えた2021年4月に、新たに薬学部・薬学研究科から4回生2名、修士課程大学院生4名、医学部から4回生1名を受入れ、研究教育指導を開始した。また9月付けで沖川助教が着任し、教育研究指導体制を強化した。

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の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。これまでに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ている。今年度はこの技術を用いてBCAA代謝と細胞運命制御の分子機構の解明に取り組み、白血病のみならず固形腫瘍においてもBCAA代謝リプログラミングが生じることを示唆する結果を得た。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、特定の細胞内シグナル経路の関与を見出した。今後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。今年度は、修飾活性を持つ細胞抽出液からMsi2の修飾酵素を単離するため、精製の条件検討を進めた。また、至適活性温度や塩濃度等、いくつかの特徴的な特性を明らかにした。今後は、これらの知見を元に修飾酵素の同定を目指す。

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と抗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いる。現在、生命科学研究科の今村博臣博士との共同研究で、BCAAバイオセンサーを用いた細胞内アミノ酸代謝動態の可視

化技術により、分岐鎖アミノ酸ダイナミクスがどのように乳がん幹細胞を制御しているか解析を進めている。本研究により、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つな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. Our research has revealed 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 have been collaborating with the Edison lab of the University of Georgia and the Kaji lab of the Institute for Chemical Research at Kyoto University to develop a new technique that allow us to monitor the conversion of BCKAs to BCAAs *in realtime* in live cancer 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 indicated that RNA-binding proteins（RBPs）play pivotal roles in the regulation of self-renewal by modulating fates of coding and non-coding RNAs both in normal tissue stem cells and cancer. 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 Msi2 activity is regulated. We have been collaborating with the Molecular Structure Center at Nagoya University to identify a molecule which regulates Msi2 activity, and 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 leads 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. To analyze how BCAAs regulate breast cancer stem cells, we are working to develop a method for visualizing BCAA dynamics at individual cell level by utilizing BCAA biosensor, which is developed by Dr. Hiromi Imamura of the Graduate School of Biostudies at Kyoto University. 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

Jimbo K, Nakajima-Takagi Y, Ito T, Koide S, Nannya Y, Iwama A, Tojo A, Konuma T. Immunoglobulin superfamily member 8 maintains myeloid leukemia stem cells through inhibition of β-catenin degradation.（2022）**Leukemia** in press

Nakagawa, M., Yamaguchi, M., Endo, M., Machida, Y., Hattori, A., Tanzawa, F., Tsutsumi, S., Kitabayashi, I., Kawai, A., and Nakatani, F. Clinical usefulness of 2-hydroxyglutarate as a biomarker in IDH-mutant chondrosarcoma.（2022）. **J Bone Oncol** *34*, 100430.

Ohtawa T, Hattori A, Isokawa M, Harada M, Funatsu T, Ito T, Tsunoda M.（2021）Determination of intracellular 2-hydroxyglutarate enantiomers using two-dimensional liquid chromatography. **J Chrom Open** 1:100005.

Kozawa K, Sekai M, Ohba K, Ito S, Sakoh H, Maruyama T, Kakeno M, Shirai T, Kamasaki T, Kohashi K, Tanaka S, Ishikawa S, Sato N, Asano S, Suzuki H, Tanimura N, Mukai Y, Gotoh N, Tanino M, Tanaka S, Natsuga K, Soga T, Nakamura T, Yabuta Y, Saitou M, Ito T, Matsuura K, Tsunoda M, Kikumori T, Iida T, Mizutani Y, Miyai Y, Enomoto A, Fujita Y.（2021）The CD44/COL17A1 pathway plays a vital role in the formation of multilayered, transformed epithelia. **Curr Biol** 31:3086-97.e7.

Okigawa, S., Yamaguchi, M., Ito, K. N., Takeuchi, R. F., Morimoto, N., & Osakada, F.（2021）. Cell type-and layer-specific convergence in core and shell neurons of the dorsal lateral geniculate nucleus. **J Comp Neurol** *529*（8）, 2099-2124.

中野隆斗、伊藤貴浩（2021）「がんにおける分岐鎖アミノ酸代謝の重要性」**実験医学** , 39, 1707-13.

Presentations

Yamamoto Y. and Hattori, A. *Regulation of branched-chain amino acid metabolism in chondrosarcoma.* The 5th Annual Meeting of the Japanese Society of Sarcoma. Selected Talk. Feb 2022.

Yamamoto Y. and Hattori, A. *The DBHS family proteins in leukemogenesis.* The 26th Annual Meeting of Hematologic Malignancies. Online. Selected Talk. Jan 2022.

Hattori, A. *The RNA binding protein Nucleolin is essential for stem cell maintenance in myeloid leukemia.* The 26th Annual Meeting of Hematological Malignancies. Selected Talk. Jan 2022.

Ito, T. *BCAA metabolism regulates stem cell fates in cancer.* The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Invited talk. Dec 2021

Yamamoto Y. and Hattori, A. *Essential Role of activated BCAA metabolism in chondrosarcoma.* The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Poster presentation. Dec 2021.

Ito, T. *Metabolic reprogramming of stem cell fates in myeloid leukemia.* The 5th Research Seminar: Frontiers in Hematology. Invited talk. Nov 2021

Ito, T. *Metabolic regulation of stem cell fates in myeloid leukemia.* The 81st Annual Meeting of Japanese Society of Hematology. Invited talk. Sep 2021

Hattori, A. *Amino acid metabolism in cancer.* The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Yokohama. Invited talk. Sep 2021.

Hattori, A. *Metabolic changes during leukemia progression.* The 31st Annual Conference on New Drug Discovery. Online. Invited talk. Aug 2021.

Ito, T. *Amino acid metabolism in oncogenesis.* Redox R&D Conference. Invited talk. Aug 2021

Ito, T. *Metabolic regulation of cancer cell fate in myeloid leukemia.* The 18th Stem Cell Symposia. Invited talk. May 2021

Ito, T. *Reprogramming cell fates by RNA binding proteins in stem cells and cancer.* RNA and Disease. The Annual Meeting of the American Society of Biochemistry & Molecular Biology（ASBMB）& Experimental Biology 2021（EB2021）. Invited talk. Apr 2021

Ito, T. *Metabolic regulation of cancer cell fate in myeloid leukemia.* The 9th International Symposium of Gunma University Initiative for Advanced Research（GIAR）. Invited talk. Feb 2021.

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。また、顕微鏡やフローサイトメトリーに関する光学技術の開発も行っている。

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-Actibatable（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。本年度は、PA-Tet システムの高感度化や多色化に成功した。光を用いた遺伝子発現制御ツールは、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。現在、転写因子の発現動態を光制御した時の下流の遺伝子発現の変動を、NGS を用いて解析している。

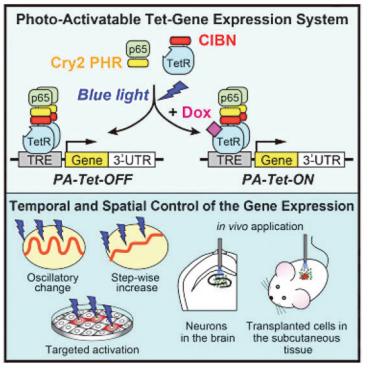


Fig. 1. Optical regulation of gene exressions by photo-activatable transcription factors

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）。また、これらのメカニズムは、マウス成体脳に存在する休眠期の神経幹細胞にも重要な機能を担っていることを明らかにした。

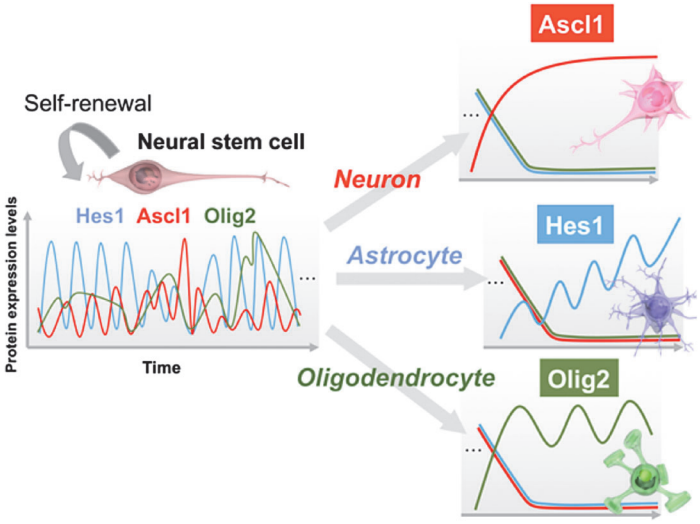


Fig. 2. Oscillatory v.s. sustained expressions of bHLH transcription factors regulate neural stem cells

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）. In this year, we have succeded in developing more

sensitive and different color-resposible PA-Tet transcription factors.

2）Reguratory mechanism of neura 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 highlight 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. In this year, we have shown that this regulatory mechanism is critically important in the neural stem cell of the adult mouse brains. 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 Publications

Yujin Harada, Mayumi Yamada, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama, Yutaka Suzuki, Takaaki Kuniya, Shohei Furutachi, Daichi Kawaguchi, Yukiko Gotoh.（2021）. Cell cycle arrest determines adult neural stem cell ontogeny by an embryonic Notch-nonoscillatory Hey1 module. **Nature Communications.** 12（1）

Takashi Kaise, Masahiro Fukui, Risa Sueda, Wenhui Piao, Mayumi Yamada, Taeko Kobayashi, Itaru Imayoshi, Ryoichiro Kageyama.（2022）. Functional rejuvenation of aged neural stem cells by Plagl2 and anti-Dyrk1a activity. **Genes & Development.** 36（1-2）23-37

Yukiko U Inoue, Yuki Morimoto, Mayumi Yamada, Ryosuke Kaneko, Kazumi Shimaoka, Shinji Oki, Mayuko Hotta, Junko Asami, Eriko Koike, Kei Hori, Mikio Hoshino, Itaru Imayoshi, Takayoshi Inoue.（2021）. An Optimized Preparation Method for Long ssDNA Donors to Facilitate Quick Knock-In Mouse Generation. **Cells.** 10（5）

List of Presentations

今吉格 「高速超解像から大規模 3D まで、バイオイメージングを遍くカバーする最新顕微鏡技術群」 第 44 回日本神経科学大会、2021 年 7 月 30 日

今吉格 「Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using optogenetics」 第 1 回 CJK 国際会議、2021 年 7 月 31 日

今吉格 「Roles of postnatal and adult neurogenesis in brain development and maturation」 The 80th Fujihara Seminar、2021 年 8 月 30 日

今吉格 「微弱発光イメージングによる神経幹細胞の制御機構の解析 Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using optogenetics」 Olympus Innovation Forum 2021 Online、2021 年 12 月 16 日

今吉格 「遺伝子発現の光操作を用いた神経幹細胞の制御機構の解析」 慶應医学部新次元開拓セミナー、2022 年 3 月 3 日

今吉格 「Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using optogenetics」 The International Symposium on Development and Plasticity of Neural Systems、2022 年 3 月 16 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）ウイ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）ウイルスセンサーによるウイルス由来 RNA の特異的認識機構の研究
3）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）
4）B 型肝炎ウイルスの新たな感染動物モデルの樹立
5）cccDNA を標的とした抗 B 型肝炎ウイルス薬剤の探索
6）ウイ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）Use of rice bran derived double-stranded RNA for prophylactic and therapeutic purposes against viral infections
4）Establishing new animal infection model for hepatitis B virus
5）Screening of anti hepatitis B virus chemicals by using cccDNA inhibition assay
6）Study on autoimmunity caused by dysfunction of viral RNA sensors

List of Publications

Khalil, J., Yamada, S., Tsukamoto, Y., Abe, H., Shimojima, M., Kato, H., and Fujita, T.（2021）. The Nonstructural Protein NSs of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Causes a Cytokine Storm through the Hyperactivation of NF-*κ*B. **Mol Cell Biol** *41*, 2020 doi/10.1128/MCB.00542-20

Khalil, J., Kato, H., and Fujita, T.（2021）. The Role of Non-Structural Protein NSs in the Pathogenesis of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome. **Viruses** *13*, 876 doi/10.3390/v13050876

Li, R., Ouda, R., Kimura, C., Narita, R., Nishimura, H., Fujita, T., Watanabe, T.（2021）. Conversion of beech wood into antiviral lignin − carbohydrate complexes by microwave acidolysis. **ACS Sustainable Chem Eng** *9*, 9248-9256. doi/10.1021/acssuschemeng.1c01450

Kawashima, K., Isogawa, M., Onishi, M., Baudi, I., Saito, S., Nakajima, A., Fujita, T., Tanaka, Y.（2021）. Restoration of type I interferon signaling in intrahepatically primed CD8+ T cells promotes functional differentiation. **JCI Insight** *6*, doi/10.1172/jci.insight.145761

加藤博己、早田信正、藤田尚志（2021）. I 型インターフェロノパシーと JAK 阻害剤　血液内科 *82*, 673-677.

List of Presentations

Fujita, T. Innate immune responses against viral infections. College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, China（Zoom Meeting March 25th 14:00 JST 2021）

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

准教授　　三浦　智行　　Assoc. Prof.　Tomoyuki Miura

2021 年 3 月に Yalcin Pisil が人間・環境学研究科博士課程を修了し、4 月から研究員となった。研究生の王梓涵と張原銘が、4 月に人間・環境学研究科修士課程 1 年に入学し、また、兵役のため休学していた趙庚鶴が、韓国在住のままリモートで人間・環境学研究科修士課程 1 年に復学した。10 月に大使館推薦の国費留学生として Sandra Morales Ruiz 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）。2021 年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

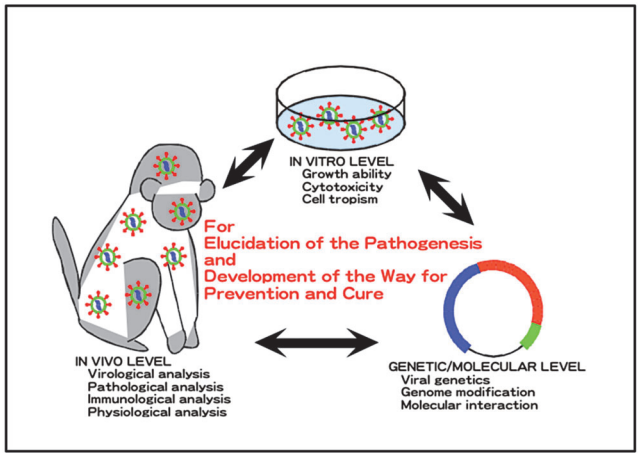


Fig.1. Research Cycle of Primate Model for Infectious Diseases

長寿命のマクロファージは抗レトロウイルス薬併用療法中に高病原性 SHIV 感染アカゲザルの血中ウイルス量を維持する

HIV 治療の大きな障害の 1 つに、抗レトロウイルス薬併用療法（cART）中の、長寿命感染細胞として知られる「ウイルスリザーバー」がある。HIV リザーバー研究の多くは、これまで休止中の CD4 陽性 T 細胞の特性評価に向けられてきたが、最近、マクロファージが HIV の持続感染に大きく寄与する可能性について報告された。Honeycutt らは、ヒト骨髄移植マウス（MoM）モデルを使用して、マクロファージにおける HIV 持続感染の可能性を報告した。彼らは短命の感染マクロファージを発見したが、HIV-1 に感染した MoM に長命の感染マクロファージが存在するのではないかと推察した。ウイルスの持続感染におけるマクロファージの重要性をさらに裏付けるために、ここでは、高病原性の SHIV に感染したアカゲザルに cART を施し、いくつかの経時的データセットを定量的に分析した。このモデルでは、感染初期の 3 ～ 4 週間でアカゲザルの全身の CD4 陽性 T

細胞は枯渇し、その後、ウイルス産生細胞のほとんどがマクロファージとなる「マクロファージ感染期」が続く。驚いたことにマクロファージ感染期に cART の下でウイルス量の減少は三相曲線を示すことが明らかとなった。これは、寿命の異なるマクロファージ集団が少なくとも 3 種類存在することを示唆する。そして、最長寿命のマクロファージの半減期は約 346 日と推定され、cART 下で 3.5 年間検出限界を超えるウイルス量を維持しうると計算された。さらに、免疫蛍光染色技術を使用して、cART 下のアカゲザルの脾臓でウイルス RNA を発現するマクロファージを同定した。これらの観察結果は、SHIV 感染アカゲザルにおいて cART 下で数年間にわたって血中ウイルス量を維持しうる長寿命のマクロファージ集団が存在することを初めて示すものであり、HIV のリザーバーを理解する上で役立つモデルとして期待される（Fig. 2）。

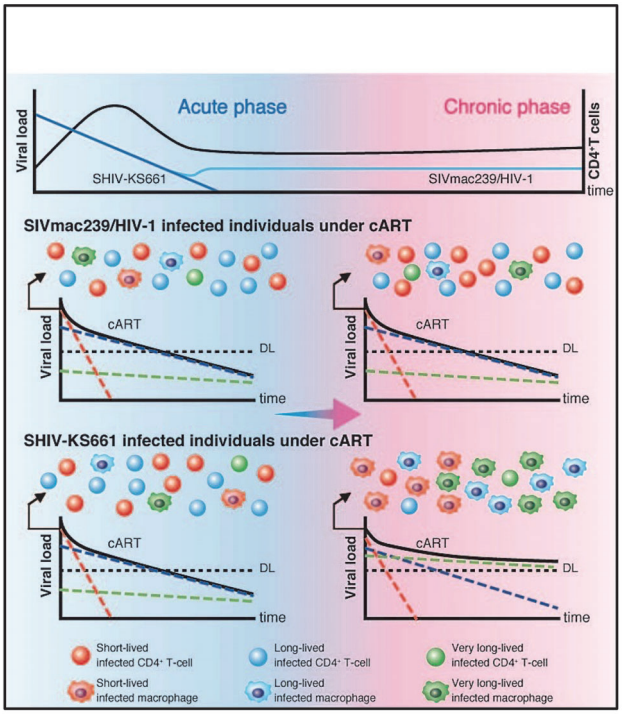


Fig.2 Proposed model of the dynamics and significance of macrophage cells for viral reservoirs.

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 2021 will be described below.

Long-lived cells among heterogeneous macrophage populations maintain viral load in a highly pathogenic SHIV infected Rhesus macaque during combination antiretroviral therapy

One major obstacle for HIV cure is “viral reservoir（s）”, also known as long lived infected cells, during combination antiretroviral therapy（cART）. Although most of effort for HIV reservoir research has been made on the characterization of resting CD4+ T cells, recently, it is reported that macrophages might greatly contribute HIV persistence. Honeycutt and colleagues reported a possibility of HIV persistence in macrophages using a humanized myeloid-only mouse（MoM）model. They only found short-lived infected macrophages but suspected the existence of long-lived infected macrophages in HIV-1 infected MoMs. To further support the importance of macrophages on viral persistence, here, a highly pathogenic SHIV-KS661 infected Rhesus macaques were treated with cART, and we quantitatively analyzed several time-course datasets. During the initial 3-4 weeks of infection, a systemic depletion of CD4+ T cells in the macaques were

induced, and followed by the later “macrophage phase” in which most of the virus-producing cells are macrophage. Surprisingly, we found the decay of viral load showed tri-phasic curves under cART during the macrophage phase. This implies that at least there are three macrophage populations having different lifespans. We also estimated the half-life of the longest-lived macrophages is around 346 days meaning the macrophages maintain viral load above detection limit for 3.5 years under cART. Furthermore, using immunofluorescence staining technics, we identified the viral-RNA-expressing macrophage in spleen of the macaque with cART. These observations represent the first evidence that heterogeneous long-lived macrophage populations exist and maintain viral load in years in SHIV-KS661 infected macaques with cART（Fig. 2）.

List of Publications

Kobayakawa, T., Tsuji, K., Konno, K., Himeno, A., Masuda, A., Yang, T., Takahashi, K., Ishida, Y., Ohashi, N., Kuwata, T., Matsumoto, K., Yoshimura, K., Sakawaki, H., Miura, T., Harada, S., Matsushita, S., Tamamura, H.（2021）. Hybrids of Small-Molecule CD4 Mimics with Polyethylene Glycol Units as HIV Entry Inhibitors. J. Med. Chem., 64, 1481-1496.

Matsuoka, S., Kuwata, T., Ishii, H., Sekizuka, T., Kuroda, M., Sano, M., Okazaki, M., Yamamoto, H., Shimizu, M., Matsushita, S., Seki, Y., Saito, A., Sakawaki, H., Hirsch, V. M., Miura, T., Akari, H., Matano, T.（2021）. A Potent anti-Simian Immunodeficiency Virus Neutralizing Antibody Induction Associated with a Germline Immunoglobulin Gene Polymorphism in Rhesus Macaques. J. Virol., 95（7）, e02455-20.

Kato, S., Shida, H., Okamura, T., Zhang, X., Miura, T., Mukai, T., Inoue, M., Shu, T., Naruse, T. K., Kimura, A., Yasutomi, Y., Matsuo, K.（2021）. CD8 T Cells Show Protection against Highly Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus（SIV）after Vaccination with SIV Gene-Expressing BCG Prime and Vaccinia Virus/Sendai Virus Vector Boosts. J. Virol., 95（4）, e01718-20.

Pisil, Y., Shida, H., Miura, T.（2021）. A Neutralization Assay Based on Pseudo-Typed Lentivirus with SARS CoV-2 Spike Protein in ACE2-Expressing CRFK Cells. Pathogens, 10（2）, 153.

Pisil, Y., Yazici, Z., Shida, H., Miura, T.（2021）Is SARS-CoV-2 neutralized more effectively by IgM and IgA than IgG having the same Fab region?（2021）. Pathogens, 10（6）, 751.

Iwamoto, Y., Seki, Y., Taya, K., Tanaka, M., Iriguchi, S., Miyake, Y., Emi E. Nakayama, E. E., Miura, T., Shioda, T., Akari, H., Takaori-Kondo, A., Kaneko, S.（2021）. Generation of macrophages with altered viral sensitivity from genome-edited rhesus macaque iPSCs to model human disease. Mol. Ther. Methods Clin. Dev., 21, 262-273.

List of Presentations

Yalcin Pisi、Zafer Yazici、Hisatoshi Shida、Tomoyuki Miura　Is SARS-CoV-2 neutralized more effectively by IgM and IgA than IgG having the same Fab region?　第 34 回近畿エイズ研究会学術集会、WEB 開催、2021 年 6 月 12 日

Hisatoshi Shida、Seiichi Kato、Tomotaka Okamura、Tetsu Mukai、Makoto Inoue、Tsugumine Shu、Tomoyuki Miura、Yasuhiro Yasutomi、Kazuhiro Matsuo　Protective effects of immunization using urease-deficient BCG, vaccinia LC16m8d, and sendai virus expressing SIV genes.　第 34 回近畿エイズ研究会学術集会、WEB 開催、2021 年 6 月 12 日

関 洋平、齊藤 暁、鷲崎 彩夏、原田 恵嘉、村田 めぐみ、引地 優太、吉村 和久、石井 洋、佐藤 賢文、Islam M Saiful、大出 裕高、岩谷 靖雅、芳田 剛、保富 康広、俣野 哲朗、三浦 智行、明里 宏文　根治療法の評価研究に有用な HIV 潜伏感染霊長類モデルの樹立　第 34 回近畿エイズ研究会学術集会、WEB 開催、2021 年 6 月 12 日

岩本 芳浩、関 洋平、鷲崎 彩夏、田谷 かほる、田中 正宏、入口 翔一、三宅 康行、中山 英美、三浦 智行、塩田 達夫、明里 宏文、高折 晃史、金子 新　非ヒト霊長類疾病モデル作成を目的としたゲノム編集アカゲザル iPSC からのウイルス感受性を変化させたマクロファージの再生　第 34 回近畿エイズ研究会学術集会、WEB 開催、2021 年 6 月 12 日

西本 佳那子、三浦 弓月、阪脇 廣美、三浦 智行、伊吹 謙太郎　SIV 感染サル化マウスにおける IL-6 動態の解析　第 68 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、2021 年 11 月 16-18 日

鷲崎 彩夏、関 洋平、齊藤 暁、村田 めぐみ、Weikeat Tan、Anastasiia Kovba、原田 恵嘉、Satyajit Biswas、引地 優太、吉村 和久、佐藤 賢文、Islam M Saiful、大出 裕高、岩谷 靖雅、保富 康広、俣野 哲朗、三浦 智行、明里 宏文　エリートコントローラーにおける loss of control リスク評価の指標としての Active reservoir size の意義　第 35 回日本エイズ学会学術集会、東京、2021 年 11 月 21-23 日

Anastasiia Kovba、鷲崎 彩夏、関 洋平、Weikeat Tan、村田 めぐみ、松岡 和弘、平野 淳、Satyajit Biswas、齊藤 暁、原田 恵嘉、引地 優太、吉村 和久、石井 洋、大出 裕高、保富 康広、俣野 哲朗、三浦 智行、岩谷 靖雅、明里 宏文　ART はエリートコントローラー霊長類モデルにおける active reservoir size の顕著な低減を引き起こす　第 35 回日本エイズ学会学術集会、東京、2021 年 11 月 21-23 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、独自の霊長類モデルを用いて、難治性ヒト感染症の原因ウイルスが引き起こす様々な病態や持続感染機構の解明、及び新規治療法やワクチンの開発研究を行っている。

HIV 感染霊長類モデルを用いた HIV 根治療法の有効性評価に関する研究

新規 HIV 感染霊長類モデルによる、既存の末梢血での HIV 定量法に加えリンパ組織におけるリザーバー定量法を駆使し、独自に開発を進めている HIV 根治治療法の有効性評価を実施している。この結果に基づき HIV 根治治療法の臨床応用への可能性を検証することが本研究の目的である。

viremia 陽性の HIV 持続感染サルへ ART 投与により viremia は検出感度以下となり、また ATI によりリバウンドが検出された。次に HIV 潜伏感染ザルへの ART では、リンパ節細胞における proviral DNA, vRNA が低下、特に vRNA の大幅な低下により、active reservoir の指標 vRNA/pDNA（R/D 比）が著減した。さらに ART 中断により proviral DNA, vRNA ともに増加し ART 以前のレベルに復帰した。これらの結果より、HIV 潜伏感染ザルに関する以下の知見を得た。①免疫学的コントローラー状態であっても、リザーバーサイズの定量評価が可能であること、② ART 抵抗性リザーバーが存在すること、③ ART フリー状態での LRA による HIV 再活性化効果を評価可能な潜伏感染モデル（エリートコントローラー（EC）に相当する免疫学的コントローラー）であること、④ EC への予防的 ART によるリザーバーサイズ縮減効果ならびに loss of control 治療効果の可能性を示した。これらの成果は、優勢な抗ウイルス免疫機能を維持した潜伏感染ザルを用いることにより ART & LRA によるリザーバーサイズ縮減効果を評価可能であることを示している。今後、これらの結果を論文化するため、リザーバーサイズ細胞におけるウイルスゲノムの解析を含め、必要な知見を蓄積する。さらに、10MA-1, JQ1 からなる cLRA と ART の同時投与によるリンパ節内のリザーバーサイズ縮減効果について検討を進める。

STLV-1 自然感染ニホンザルを用いた HTLV-1 感染防御免疫に関する研究

1. 成人 T 細胞白血病細胞の抗原性増大による新規免疫療法の開発

これまでに HTLV-1 の近縁ウイルスである STLV-1 に高率に自然感染したニホンザルをモデルとして、サルにおける STLV-1 特異的 CTL 応答の解析系を作成するとともに、サルの自家感染細胞を抗原として免疫接種実験を行った。その結果、STLV-1 特異的 CTL が活性化し、少なくとも半年間維持されることを見出した。これと平行して、本解析に必要であった STLV-1 特異的細胞性免疫応答によるウイルス転写抑制機構に関する基礎的解析を進めた。STLV-1 感染ニホンザル血液から分

離したPBMCの培養により、全てのサル個体由来PBMCにおいて高いtax mRNA発現誘導が認められた。CD8+ T細胞の共存下ではCD4+T細胞単独の場合と比較して、tax mRNAコピー数の顕著な減少が認められた。この原因として、CD8+ T細胞が産生するIFNγによりSTLV-1転写阻害活性を示すことや、この活性がウイルス制御に寄与していることが示唆された。以上より、STLV-1自然感染ニホンザルはHTLV-1感染の霊長類モデルとして、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。

2. 抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンによる母子感染予防法に関する研究

STLV-1感染ニホンザルに抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンを投与し、その安全性及びPVL抑制効果についてフォローアップ解析を進めた。現在までのところ、安全性とともに一定のPVL抑制効果があるように見られるが、詳細は今後の経過観察結果を待つ必要がある。他方、母子感染STLV-1に関する長期フォローアップ解析において、持続的なPVL陽性を示しているが3年以上を経過しても抗STLV-1抗体の陽転化を生じない例や、出生後一過的なPVL陽性を示した後消失し3年以上を経過してもなおPVL、抗STLV-1抗体ともに認められない例について解析を進めている。特にその母子感染に掛かる詳細を明らかにするため、RAISING法によるSTLV-1クローナリティ分析およびそれに必要なNGSデータの解析システム確立を進めている。

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.

Evaluation in the efficacy of HIV cure therapeutics in a non-human primate model of HIV infection

Despite effective suppression of virus replication and maintenance of undetectable virus loads for years, elite controllers（ECs）are at the risk of losing the control over HIV-1 infection and progression to AIDS. Considering the risks for ECs without treatment, finding the proper timing of antiretroviral treatment（ART）initiation is indispensable. One problem remaining is to show evidence that ART initiation in the ECs who still control the infection is reasonable and that ART is beneficial to ECs. The most recent international guidelines state that the clinical benefit of ART in ECs is unclear, making it difficult for clinicians to decide the timing to start ART in ECs. Recent research in our laboratory showed that the ratios between virus CA-RNA and CA-DNA（R/D ratio）in the lymph nodes served as a marker for the level of active virus replication in a non-human primate model of latent HIV infection. It was also shown that the R/D ratio in the monkeys of the long-term latency group were significantly lower than that in the loss-of-control group, indicating that this high R/D may be associated with the loss-of-control. Furthermore, the ART efficiently reduced the active reservoir size in the lymphoid tissues. These results provide first direct evidence of the lymphoid tissue virus

reservoir reduction under ART in EC. On the basis of these results, we are planning to examine the effect of latency-reversing agents together with ART on the reactivation and elimination of the HIV reservoir cells in the macaques.

Immunization with autologous PBMCs efficiently activated STLV-1-specific CTL and reduced proviral loads in naturally STLV-1-infected Japanese monkeys

A small proportion of HTLV-1-infected individuals develop adult T-cell leukemia/lymphoma（ATL）, a chemotherapy-resistant malignant disease with poor prognosis. HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T-lymphocytes（CTLs）act as an anti-tumor/virus defense system, which is impaired in ATL patients. Vaccines to activate these CTLs are expected to contribute to anti-ATL therapy and prophylaxis. Here, we aimed to develop a new immunotherapy for activating such CTLs, by using autologous peripheral blood mononuclear cells（PBMCs）as a vaccine, based on our previous finding that ATL cells express viral antigens and become immunogenic following short-term culture. To examine this possibility, we used Japanese monkeys naturally infected with simian T-cell leukemia virus type-1（STLV-1）, which is closely related to HTLV-1. The infected macaques were immunized with MMC-treated autologous STLV-1-infected PBMCs. We found that STLV-1-specific CTL responses were markedly induced by the immunization, which was in parallel with lowered STLV-1 proviral loads. These findings will provide evidence that the autologous PBMCs may activate STLV-1-specific CTLs and control STLV-1-infected cells in vivo, implying the potential use of autologous PBMCs as a new therapeutic vaccine candidate against ATL.

List of Publications

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: 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** 95, e02455-20, 2021.

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** 21, 262-273, 2021.

Yoshida T, Takemoto H, Sakamaki T, Tokuyama N, Hart J, Hart T, Dupain J, Cobden A, Mulavwa M, Hashimoto C, Isaji M, Kaneko A, Enomoto Y, Sato E, Kooriyama T, Miyabe-Nishiwaki T, Suzuki J, Saito A, Furuichi T, Akari H: Prevalence of antibodies against human respiratory viruses potentially

involving anthropozoonoses in wild bonobos. **Primates** 62, 897-903, 2021.

Washizaki A, Murata M, Seki Y, Kikumori M, Tang Y, Tan W, Wardani NP, Irie K, Akari H: Synergistic HIV reactivation and minimal global activation by the novel PKC activator 10-Methyl-aplog-1 in combination with JQ1. **Viruses** 13, 2037, 2021.

List of Presentations

明里宏文：霊長類研究に学ぶポストコロナ戦略～野生サルの感染症から学ぶ．第 37 回日本霊長類学会大会（公開市民講座）．2021 年 7 月 18 日、オンライン開催

村田めぐみ、長谷川温彦、鷲崎彩夏、関洋平、兼子明久、森本真弓、夏目尊好、安永純一朗、松岡雅雄、神奈木真理、明里宏文：STLV-1 自然感染ニホンザルにおける STLV-1 特異的 T 細胞応答の解析 . 第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2021 年 11 月 5-7 日

村田めぐみ、Maureen Kidiga、鷲崎彩夏、関洋平、兼子明久、森本真弓、夏目尊好、安永純一朗、松岡雅雄、水上拓郎、明里宏文：ニホンザル STLV-1 母子感染における PVL 陽性・抗体陰性例の解析 . 第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2021 年 11 月 5-7 日

長谷川温彦、村田めぐみ、片桐邦子、鷲崎彩夏、明里宏文、増田貴夫、神奈木真理：低 CTL 応答を示す STLV-1 感染ニホンザルに対する CTL 活性化型ワクチンの効果 . 第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2021 年 11 月 5-7 日

園田未祐、安永純一朗、七條敬文、豊田康祐、樋口悠介、井上明威、野坂生郷、村田めぐみ、明里宏文、中嶋一貴、大島孝一、松岡雅雄：PD-1 の抑制は HTLV-1 bZIP factor の病原性を促進する . 第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2021 年 11 月 5-7 日

関洋平、手塚健太 平舘裕希、水上拓郎、大隈和、村田めぐみ、明里宏文、浜口功：STLV-1 自然感染ニホンザルを用いた水平感染様式解明に向けた検討 . 第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2021 年 11 月 5-7 日

岩松見、中島誠、村田めぐみ、山岸誠、手塚健太、浜口功、明里宏文、内丸薫：二次リンパ組織における STLV-1 感染細胞の局在とその意義．第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2021 年 11 月 5-7 日

七條敬文、安永純一朗、大西知帆、渡辺美穂、豊田康祐、高起良、明里宏文、野坂生郷、松岡雅雄：HTLV-1 の APOBEC3G に対する進化不適応が発がんに寄与する．第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会．2021 年 11 月 5-7 日

Anastasiia Kovba、鷲崎彩夏、関洋平、Weikeat Tan、村田めぐみ、松岡和弘、平野淳、Satyajit Biswas、齊藤暁、原田恵嘉、引地優太、吉村和久、石井洋、大出裕高、保富康広、俣野哲朗、三浦智行、岩谷靖雅、明里宏文：ART はエリートコントローラー霊長類モデルにおける active reservoir size の顕著な低減を引き起こす . 第 35 回日本エイズ学会学術集会、2021 年 11 月 21 日

鷲崎彩夏、関洋平、齊藤暁、村田めぐみ、Weikeat Tan、Anastasiia Kovba、原田恵嘉、Satyajit Biswas、引地優太、吉村和久、石井洋、佐藤賢文、Islam M Saiful、大出裕高、岩谷靖雅、保富康広、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文: エリートコントローラーにおける loss of control リスク評価の指標としての Active reservoir size の意義 . 第 35 回日本エイズ学会学術集会、2021 年 11 月 21 日

加藤孝宣、明里宏文:マーモセットの感染症～コモンマーモセットを用いた C 型肝炎ウイルスワクチン研究. 第 11 回日本マーモセット研究会大会、2022 年 2 月 2 日

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。2021 年においては、哺乳類のゲノムに隠された古代ウイルス由来の遺伝子制御機構を発見した。

1）哺乳類のゲノムに隠された古代ウイルス ―古代ウイルス特有の遺伝子制御機構の発見―

地球史の中で、三葉虫や恐竜、マンモスといった太古の生物が現れては消えていったことを現在の我々は化石を通じて知ることができます。ウイルスは化石として残りませんが、その代わりにヒトを含むほとんどの生物のゲノムにはウイルスの感染の痕跡が刻まれています。このウイルスの痕跡は内在性ウイルスと呼ばれ、宿主生物の生殖系列の細胞（卵細胞や精子、受精卵など）にウイルスが感染した場合にウイルスが宿主生物ゲノムに組み込まれることで生じます。近年、様々な生物のゲノム解読が進むにつれ内在性ウイルスの発見が相次いでおり、古代ウイルスの多様性への理解が一層進んでいます。さらに我々は、化石から太古の生物の生態を推測するように、古代ウイルスの痕跡を探すだけでなく古代ウイルスの性質も明らかにしたいと考えました。そこでレトロウイルスの RNA 制御配列に着目しました。レトロウイルスのタンパク質はメッセンジャー RNA（mRNA）から翻訳されて発現しますが、RNA 制御配列は mRNA 上に存在し、翻訳を制御することでレトロウイルスのタンパク質の合成量の調整、ひいてはウイルスの複製にとても重要な役割を担っています。これまで、現存するレトロウイルスから多くの RNA 制御配列が同定され機能研究が進んでいましたが、太古のレトロウイルスがどのような RNA 制御配列をもつのかは全く不明でした。

膨大な数の内在性レトロウイルス配列から RNA 制御配列を見つけ出すのはとても困難です。RNA 制御配列には共通した特徴がほとんどなく、mRNA のどこに RNA 制御配列があるかを判断できないからです。そこで、我々は胎盤形成遺伝子シンシチンに着目しました。シンシチン遺伝子は約 3,000 万年前に内在化したレトロウイルスに由来するという珍しい遺伝子です。我々は以前、ヒトのシンシチン mRNA の一部を欠失させるとタンパク質の発現効率が著しく減少することを発見し、この領域を SPRE と命名していました。我々はこの SPRE が古代レトロウイルスに由来する RNA 制御配列の一つなのではないかと考えました。なぜなら、シンシチンのように元々ウイルスだった遺伝子には、適切な遺伝子発現のためにウイルスの RNA 制御配列が変わらず維持されてい

る可能性が高いからです。そこで独自に構築した配列探索アプローチを用いてSPREを分析したところ、SPREが300種類以上の哺乳類の内在性レトロウイルスに見つかることが明らかとなりました。つまり、SPREはシンシチン以外の内在性レトロウイルスにとっても重要なRNA制御配列だったのです。さらに哺乳類約400種のゲノムを探索するとすべての主要な哺乳類グループのゲノムにSPREが見つかり、中にはゲノムに数千ものSPREをもつ種もいました。このことはSPREをもつレトロウイルスが多くの哺乳類に感染し内在化してきたというシナリオを提示します。一方でSPREは現存のレトロウイルスからは見つかりませんでした。さらに、我々はシンシチン遺伝子を用いてSPREの機能を実験的に検証しました（**図1**）。そしてSPREがシンシチン遺伝子の発現を促進する仕組みの一端を解明し、シンシチンの発現にSPREを必要としないような条件を見つけることにも成功しました。

今回の研究から、内在性レトロウイルスには、現存のレトロウイルスにはみられないような独自のRNA制御配列をもつことが明らかとなりました。一方で、これまでにデータベース化されている数万種類の内在性レトロウイルスの中でSPREをもつものは1%未満です。このことは、SPREは内在性レトロウイルスがもつRNA制御配列の氷山の一角であり、我々が知らないRNA制御配列がまだゲノムに存在することを示唆します。このようなRNA制御配列が我々のゲノムにどのような影響を及ぼすのかを調べることも今後の課題です。

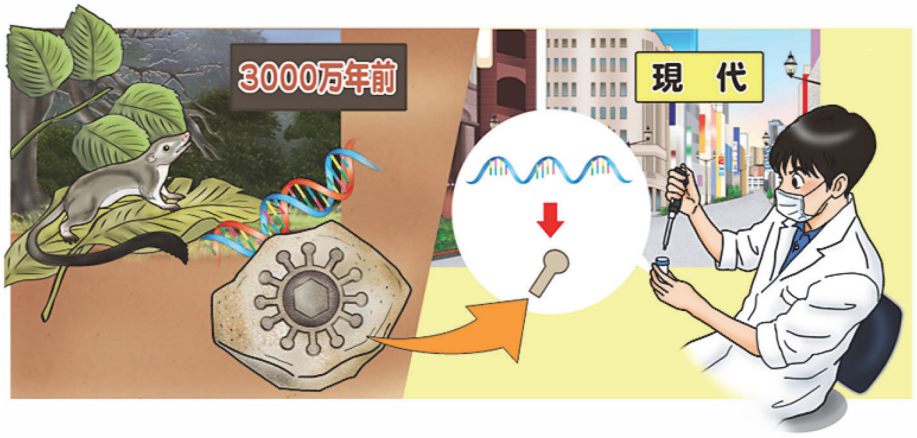


図1. 乳類ゲノムに残るレトロウイルス感染の痕跡「内在性レトロウイルス」を解析することで、太古のレトロウイルスのRNA制御配列を同定し、その遺伝子発現促進機構を実験的に検証しました。

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 2021, we discovered an ancient virus-derived gene regulatory mechanism hidden in the mammalian genome.

1）An ancient retroviral RNA element hidden in mammalian genomes and its involvement in co-opted retroviral gene regulation

Retroviruses utilize multiple unique RNA elements to control RNA processing and translation. However, it is unclear what functional RNA elements are present in endogenous retroviruses（ERVs）. Gene co-option from ERVs sometimes entails the conservation of viral cis-elements required for gene expression, which might reveal the RNA regulation in ERVs. Here, we characterized an RNA element found in ERVs consisting of three specific sequence motifs, called SPRE. The SPRE-like elements were found in different ERV families but not in any exogenous viral sequences examined. We observed more than a thousand of copies of the SPRE-like elements in several mammalian genomes; in human and marmoset genomes, they overlapped with lineage-specific ERVs. SPRE was originally found in human syncytin-1 and syncytin-2. Indeed, several mammalian syncytin genes: mac-syncytin-3 of macaque, syncytin-Ten1 of tenrec, and syncytin-Car1 of Carnivora, contained the SPRE-like elements. A reporter assay revealed that the enhancement of gene expression by SPRE depended on the reporter genes. Mutation of SPRE impaired the wild-type syncytin-2 expression while the same mutation did not affect codon-optimized syncytin-2, suggesting that SPRE activity depends on the coding sequence. These results indicate multiple independent invasions of various mammalian genomes by retroviruses harboring SPRE-like elements. Functional SPRE-like elements are found in several syncytin genes derived from these retroviruses. This element may facilitate the expression of viral genes, which were suppressed due to inefficient codon frequency or repressive elements within the coding sequences. These findings provide new insights into the long-term evolution of RNA elements and molecular mechanisms of gene expression in retroviruses.

List of Publications

Kitao, K,, Nakagawa, S., Miyazawa, T.（2021）. An ancient retroviral RNA element hidden in mammalian genomes and its involvement in co-opted retroviral gene regulation. **Retrovirology** *18*（*1*）, 36.

Aso, S., Kitao, K., Hashimoto-Gotoh, A., Sakaguchi, S., and Miyazawa, T.（2021）. Identification of feline foamy virus-derived microRNAs. **Microbes Environ.**, *36*（*4*）, ME21055.

Mekata, H., Okagawa, T., Konnai, S., and Miyazawa, T.（2021）. Molecular epidemiology and whole-genome analysis of bovine foamy virus in Japan. **Viruses**, *13*（*6*）, 1017.

Sumiyoshi, A., Kitao, K., and Miyazawa, T.（2022）. Genetic and biological characterization of feline foamy virus isolated from a leopard cat（*Prionailurus bengalensis*）in Vietnam. **J. Vet. Med. Sci.** *84*（*1*）, 157-165.（Epub ahead of print Dec 9, 2021）

小林よしのり、宮沢孝幸　コロナ脳 : 日本人はデマに殺される（小学館新書）（小学館）

宮沢孝幸　京大 おどろきのウイルス学講義（PHP 新書）（PHP 研究所）

List of Presentations

Kitao, K., Nakagawa, S., and Miyazawa, T. An RNA element, SPRE, found in endogenous retroviral syncytin genes. 5th Uppsala Transposon Symposium, online, October 7–8, 2021.

北尾晃一、宮沢孝幸　卵巣で発現するヤモリ類特有の内在性レトロウイルス由来遺伝子の研究　第23回日本進化学会、オンライン、2021年8月18-21日

北尾晃一、中川草、宮沢孝幸　哺乳類の内在性レトロウイルスに見いだされたRNA制御配列の研究　第93回日本遺伝学会、オンライン、2021年9月7-9日

北尾晃一、宮沢孝幸　ヤモリ類ゲノムに1億年以上保存されているウイルス由来膜タンパク質の配列解析　第44回日本分子生物学会年会、横浜市、2021年12月1-3日

庄司日和、北尾晃一、宮沢孝幸、中川草　ウイルスから獲得した胎盤形成遺伝子syncytinの新世界ザルにおける機能比較　第44回日本分子生物学会年会、横浜市、2021年12月1-3日

Aso, S., Kitao, K., and Miyazawa T. Construction of deletion mutants of miRNAs from a molecular clone of simian foamy virus and analysis of their infection dynamics. 第44回日本分子生物学会年会、横浜市、2021年12月1-3日

宮沢孝幸　新型コロナウイルスの対策と今後の展望　日本赤外線学会創立30周年記念講演会、オンライン、2021年6月4日（招待講演）

宮沢孝幸　新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に関する解決すべき問い　第21回日本抗加齢学会総会、京都府京都市、2021年6月27日（招待講演）

宮沢孝幸　レトロウイルスによる哺乳類の進化　鳥取県産業振興機構バイオフロンティア推進室人材育成セミナー、オンライン、2021年8月25日（招待講演）

宮沢孝幸　レトロウイルスの起源と宿主の進化　第114回日本繁殖生物学会大会、オンライン、2021年9月23日（招待講演）

宮沢孝幸　動物のコロナウイルス研究から考える新型コロナウイルス対策　埼玉大学第一回市民セミナー2021、埼玉県さいたま市、2021年9月26日（招待講演）

宮沢孝幸　ウイルスとの共生・レトロウイルスによる哺乳類の進化　第161回現在生物ゼミナール兵庫県三田市、2021年12月10日（招待講演）

宮沢孝幸　ウイルスとは何か、動物とウイルスの共進化　第25回日本統合医療学会学術大会、オンライン、2021年12月19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附属感染症モデル研究センター運営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)、ゲノム編集マウス（CRISPR）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。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

2019 年	248 系統	59,031 個
2020 年	267 系統	44,428 個
2021 年	215 系統	40,528 個

2）トランスジェニックマウスの作製

	依頼数	使用胚数
2019 年	30	12,554
2020 年	2	938
2021 年	6	3,365

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
2019 年	97	34,226
2020 年	97	36,184
2021 年	97	38,469

Reproductive engineering team is a support unit for generating transgenic mouse（Tg), knockout mouse（KO）and Genome editing mouse（CRISPR）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

2019	248 strains	59,031 embryos
2020	228 strains	44,428 embryos
2021	215 strains	40,528 embryos

2）Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of injected constructs	No of injected embryos
2019	30	12,554
2020	2	938
2021	6	3,365

3）CRISPR/Cas9

	Number of requests	Number of embryos used
2019	97	34,226
2020	97	36,184
2021	97	38,469

List of Publications

Oda, Y., Takahashi, C., Harada, S., Nakamura, S., Sun, D., Kiso, K.,Urata, Y., Miyachi, H., Fujiyoshi, Y., Honigmann, A., et al.（2021）.Discovery of anti-inflammatory physiological peptides that promote tissue repair by reinforcing epithelial barrier formation. Sci Adv 7,eabj6895. 10.1126/sciadv.abj6895.

Ichijo, R., Kabata, M., Kidoya, H., Muramatsu, F., Ishibashi, R., Abe, K., Tsutsui, K., Kubo, H., Iizuka, Y., Kitano, S., et al.（2021）. Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs. Sci Adv 7. 10.1126/sciadv.abd2575.

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 2 年度ラット；29 匹、マウス；約 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 60 件以上の遺伝子改変・ゲノム編集マウスの作製に携わった。

Experimental animals, such as mouse and rat are housed in our Laboratory under strict regulation of animal experimental committee and institutional guidelines for animal welfare. Moreover, we have been considered for long time: how to make gene-manipulated mice more rapidly and conveniently. Recently, genome engineering methods have been established using TALEN or CRISPR-Cas9 systems. We have searched for many methods and finally developed our own protocol making such mice more easily and reproducibly. We newly developed more than 60 gene-manipulated mouse strains in this year.

List of Publications

Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, Sakaguchi N, Sakaguchi S, **Kondoh G**, Morinobu A, Mimori T, **Hirota K**. Dispensable roles of Gsdmd and Ripk3 in sustaining IL-1β production and chronic inflammation in Th17-mediated autoimmune arthritis. ***Sci Rep***. 11:18679.（**2021**）.

Shirakashi M, Maruya M, **Hirota K**, Tsuruyama T, Matsuo T, Watanabe R, Murata K, Tanaka M, Ito H, Yoshifuji H, Ohmura K, Elewaut D, Sakaguchi S, Fagarasan S, Mimori T, Hashimoto M. Effect of Impaired T Cell Receptor Signaling on the Gut Microbiota in a Mouse Model of Systemic Autoimmunity. ***Arthritis Rheumatol***. 2021 Nov 1. Online ahead of print.

Kawakami R, Kitagawa Y, Chen KY, Arai M, Ohara D, Nakamura Y, Yasuda K, Osaki M, Mikami N, Lareau

CA, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**, Ohkura N, Sakaguchi S. Distinct Foxp3 enhancer elements coordinate development, maintenance, and function of regulatory T cells. ***Immunity***. 54:947-961. e8.（**2021**）.

Nakagawa, T., Jörg, D. J., **Watanabe, H.,** Mizuno, S., Han, S., Ikeda, T., Omatsu, Y., Nishimura, K., Fujita, M., Takahashi, S., **Kondoh, G.,** Simons, B. D., Yoshida, S. and Nagasawa, T. A multistate stem cell dynamics maintains homeostasis in mouse spermatogenesis. ***Cell Reports***, Oct 19;37（3）:109875. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109875.

小原乃也、**廣田圭司** 「自己免疫疾患に関わるT細胞の制御因子：創薬研究者・アカデミア研究者が知っておくべき最新の免疫学とその応用技術」：**技術情報協会** p.203-213、2021年8月31日発刊

廣田圭司 「炎症性Th17細胞による組織炎症の形成」：**炎症と免疫**、先端医学社29巻5号15-17、2021年8月20発行

廣田圭司 「臨床医が知っておくべき免疫学のいま：Pathogenicヘルパー T細胞と組織炎症」：**別冊・医学のあゆみ**、医歯薬出版株式会社 p48-53、2021年8月25発行

List of Presentations

Ohara D, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**：Foxp3+ regulatory T cells suppress chronic inflammation and fibrosis in the liver by regulating tissue cellular immunity in CCl4-induced liver injury. The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. 2021 Dec. 8-10

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
准教授	川瀬栄八郎	Assoc. Prof.	Eihachiro Kawase

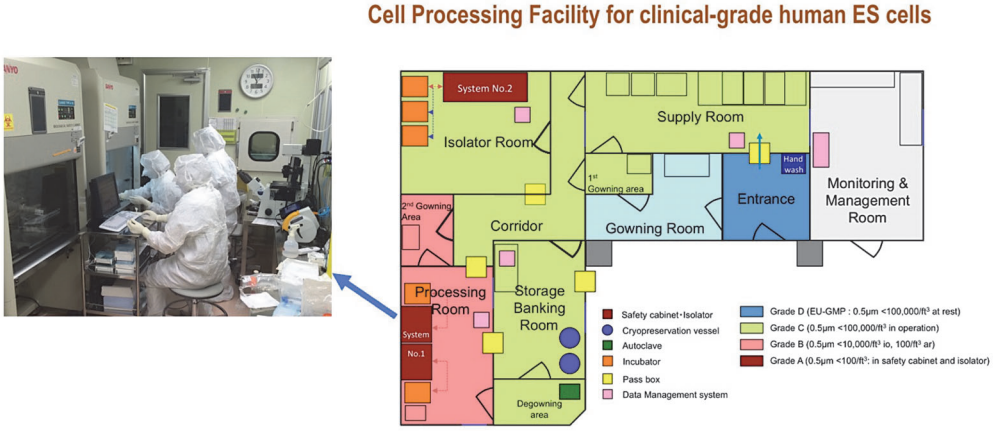
我々はヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに樹立したヒト ES 細胞株は国内の研究機関に分配され多くの研究成果が上げられている。また ES 細胞の未分化性維持や細胞分化の分子機構の解析の他、安全性の高い培養法の開発など医療応用において不可欠の技術開発研究をおこなっている。ヒト ES 細胞の臨床利用のための細胞プロセシング施設を有し、ヒト ES 細胞株の樹立，培養，操作，品質保証，安全性確保等にわたる技術開発及び取扱基準規格の構築を行っている。

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 細胞を用いる研究開発で広く活用されている。

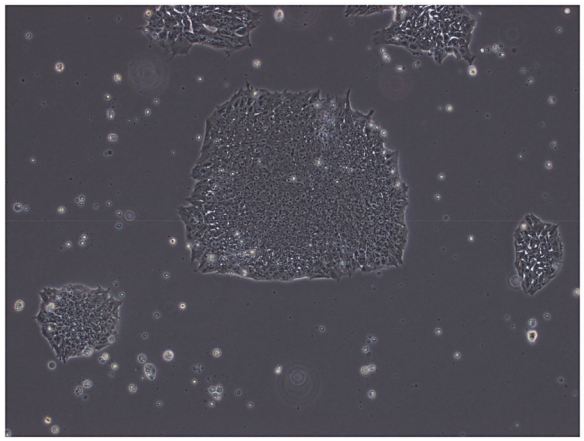
2）細胞プロセシング施設による臨床用ヒト ES 細胞バンクの構築

ヒト ES 細胞樹立指針や再生医療関連の法律の整備により、ヒト ES 細胞の臨床利用に向けての制度が整えられた。これらに対応して、新たに医薬品製造レベルでのヒト 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。

細胞株	樹立日	核型
KthES11	2018.05.07	46,XX
KthES12	2018.12.07	46,XX
KthES13	2019.4.11	46,XX
KthES14	2019.12.05	46,XX
KthES15	2020.07.01	46,XY
KthES16	2021.4.12	46,XX



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。2021 年 12 月までに 6 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。ヒト多能性幹細胞は株やクローンごとに分化特性や最終細胞製品の性能が異なる可能性が高いとされている。そのため有効性安全性の高い細胞医療の提供にはより多くの細胞株が必要になると考えられる。そのため我々は当面 30 株の作製を目指している。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 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 6 cell lines, by December 2021. Frozen stocks of these cell lines are ready for distribution to research institutes aiming clinical application of hESCs.

List of Publications

Kawase, E., Takada, K., Nakatani, R., Yamazaki, S., Suemori, H.（2021）. Generation of clinical-grade human embryonic stem cell line KthES11 according to Japanese regulations. **Stem Cell Research** 54（July）

List of Presentations

川瀬栄八郎、高田圭、末盛博文：京都大学における臨床用ヒト ES 細胞株の樹立、バンキングと品質検査におけるワークフローの構築 第 21 回日本再生医療学会総会、横浜、2022 年 3 月 18 日

高田圭、川瀬栄八郎、末盛博文:ヒト ES 細胞樹立作業におけるベンチ内細胞操作と培養の試み　第 21 回日本再生医療学会総会　横浜　2022 年 3 月 18 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、研究所の活動を広く広報している。同時に内部専用 WEB サーバを運用して、複数の建物にある共通機器やセミナー室の使用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。

昨年来の新型コロナ流行により今年度も Zoom を用いた新所員対象ネットワークセキュリティ講習会を開催し、所員の情報リテラシーの向上に努めるとともに一年を通して情報セキュリティに関するこまめな広報を行った。

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。今年度は、ヒト白血病ウイルス HLTV の持続感染細胞におけるウイルスのアンチセンス側転写産物の解析に携わり、アンチセンス mRNA が主に核内に留まり、特定の遺伝子のプロモータ領域に局在していることが明らかになった。

Institute for Frontier Life and Medical Sciences LAN system（Infront-LAN）has administrated by the information security committee. Research results and other information are actively disseminated through the official website, and the Institute's activities have been widely communicated. At the same time, an internal dedicated web server is operated to make reservations for the use of shared equipment and seminar rooms located in multiple buildings. In addition, we have established a system that integrates a large number of shared equipment through a secure network, requires experimental analysis data to be stored on a shared NAS, and safely manages the removal and movement of data.

This year, due to the outbreak of the COVID-19, we held a network security seminar for new employees via Zoom. 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 network management of the institute, Takemoto has also analyzed data of viral antisense transcripts in persistently infected cells with the human leukemia virus type 1（HLTV-1）. The study revealed that retroviral antisense RNAs retained in the nucleus associate with chromatin and have transcriptional regulatory function.

List of Publications

Ma G., Yasunaga J., Shimura K., Takemoto K., Watanabe M., Amano M., Nakata H., Liu B., Zuo X., and

Matsuoka M.（2021）. Human retroviral antisense mRNAs are retained in the nuclei of infected cells for viral persistence. **Proc Natl Acad Sci USA** 118（17）e2014783118

共同研究

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2020 年度共同研究報告（研究期間：2020 年 4 月～ 2021 年 3 月）

【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】

◯研究代表者　理化学研究所骨関節疾患研究チーム　池川　志郎　チームリーダー
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　組織再生応用分野　戸口田　淳也　教授
◯研究経過及び研究成果

インフォームドコンセントのもと、先天性側彎症（congenital scoliosis: CS）、脊椎肋骨異形成症（spondylo-costal dysostosis: SCDO）などの遺伝性側弯症 の検体（末梢血あるいは皮膚組織）を詳細な臨床情報・画像情報とともに収集した。患者、家族のゲノム DNA を抽出し、全 exome 解析により、遺伝子変異を探索した。目下、100 検体分の全 exome データを、新たに作成した独自のプログラムを用いて、解析中である。

◯研究成果の公表
（学会発表）

1. India -Japan Webinar on "Rare Genetic Disorders" by Embassy of India. Genomic Study of Rare Diseases of Skeleton. Oct. 16, 2020. Tokyo（web）
2. 「ゲノム医療と整形外科：パーソナルゲノム時代に取り残されないために」, ちば 整形外科エキスパートカンファレンス 2020, 2020.08.22, 千葉（on line 講演）
3. 「整形外科のゲノム医療：現在、過去、未来」, 第 135 回中部日本整形外科災害外学会・学術集会（教育研修講演）, 2020.10.09, 島根（on line 講演）

【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】

◯研究代表者　国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター
　平谷　伊智朗　チームリーダー
◯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

【Fitness gene profiling in chemically reprogrammed hepatic precursor cells】

◯研究代表者　MRC Centre for Regenerative Medicine University of Edinburgh　Keisuke Kaji　Professor
◯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

【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】

◯研究代表者　近畿大学医学部 再生機能医学講座　高藤 義正　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　田畑　泰彦　教授

【幹細胞の分化状態と常在収縮力の相関解析】

◯研究代表者　大阪大学大学院・基礎工学研究科　出口　真次　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　オケヨ ケネディ オモンディ　講師

【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】

◯研究代表者　国立精神・神経医療研究センター　川内 大輔　室長

◯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　永樂　元次　教授

◯研究経過及び研究成果

ヒト上衣腫由来の融合遺伝子を同定し、その発がん性について実験マウスを用いて解明することに成功した。（https://www.ncnp.go.jp/topics/2021/20210426p.html）この上衣腫マウスモデルの結果を元に、ヒト ES 細胞由来の脳腫瘍モデルを開発準備中である。

【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】

◯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

骨粗鬆症治療においては、多様な薬剤の長期投与による効果を理解、予測することが重要であるが、そのためには、薬剤投与後の骨代謝マーカーが薬剤特異的な時間的推移を示す機構を理解する必要がある。本研究は、骨代謝マーカーの推移を細胞動態に基づき解析可能な骨代謝数理モデルを構築することを目指している。まず、骨粗鬆症治療薬の破骨／骨芽前駆細胞に対する作用が長期投与における薬剤効果の推移に影響するという仮説に基づき、破骨／骨芽細胞と骨細胞の挙動を考慮した従来の数理モデルに対して破骨／骨芽前駆細胞を導入した。各前駆細胞数の時間発展式を、ロジスティック方程式に基づく増殖項と、破骨／骨芽細胞への分化による消費を表す項により表現した。さらに、力学刺激とシグナル分子濃度から推定される破骨／骨芽細胞分化の確率に対して、各前駆細胞数に応じた制約を考慮することで分化動態を規定した。ブタ大腿骨海綿骨の X 線マイクロ CT 画像から再構築した有限要素モデルに対して、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。その結果、骨芽前駆細胞に対する増殖効果が強い薬剤では、長期投与においても骨芽細胞数が維持されるため骨形成促進効果が持続することが示された。今後は、骨形成・吸収活動量に基づき骨代謝マーカーの推移を表現可能なモデルへと発展させ、効果的な治療戦略の策定を支援可能なモデル創成を目指している。

◯研究成果の公表

（学会発表）

1. 金英寛，亀尾佳貴，安達泰治，田中栄．骨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，2020 年 6 月 18 日～ 20 日，誌面開催（口演）
2. 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，2020 年 10 月 15 日～ 16 日，オンライン開催（招待講演）

【細胞のメカノトランスダクション機構に関するバイオメカニクス研究】

◯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

細胞が様々な力学刺激に対して応答することが知られている。本研究では、骨の基質内部に存在する骨細胞が、過剰な力学刺激に対して細胞内一酸化窒素（NO）産生応答を示し、アポトーシスの誘導により、骨を修復するリモデリング活動の起点となる破骨細胞が誘導されることに着目した。今年度は、力学刺激応答として、細胞質内の NO に着目することで、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、独自に開発した磁気ピンセットを用いて定量的な力学刺激を加えた。その結果、負荷する力の増加にともない細胞質内の NO 濃度（指示薬 DAR-4 M 蛍光輝度）が上昇し、アポトーシス初期の兆候である細胞収縮が観察された。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。

◯研究成果の公表

なし

【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】

◯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

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明らかになった。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も示された（Omatsu Y. et al., ***Nature***, 2014, Seike M. et al., ***Gene Dev***., 2018）。最近、ヒトにおいても CAR 細胞とほぼ同等の特徴を持つ細胞の存在が確認された（Aoki et al., ***Br. J. Haematol***. 2021）。

一方、慢性骨髄性白血病（CML）モデルである BCR-ABL キメラ遺伝子を導入した造血幹細胞移植マウス等の解析により、造血の低下した骨髄の CAR 細胞では 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。これらの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、CAR 細胞の変質に伴って発現が変化する転写因子の機能解析と、変質した CAR 細胞の動態解析を行い、ニッチの変質と再生における分子機構と細胞動態を明らかにすること

を目的とした。

造血の低下を伴う複数のマウスモデルにおいて共通して CAR 細胞で発現が上昇する機能不明の遺伝子について、その機能解析のために flox マウスの作製を行った。先行して作製できたマウスは、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、得られたマウスの定常時および造血器腫瘍モデル等における骨髄造血と CAR 細胞の経時的変化の解析を進行している。

○研究成果の公表

（発表論文）

Kazunari A., Kurashige M., Ichii M., Higaki K., Sugiyama T., Kaito T., Ando W., Sugano N., Sakai T., Shibayama H., HANDAI Clinical Blood Club, Takaori-Kondo A., Morii E., Kanakura Y., Nagasawa, T. Identification of CXCL12-abundant reticular cells in human adult bone marrow. ***Br. J. Haematol***. 2021 doi: 10.1111/bjh.17396. Online ahead of print.

【組織形成における概日時計成立の生物学的意義】

○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

地球の自転による 24 時間周期の環境変化を、生物は概日時計として遺伝子レベルで内包している。その概日時計は環境周期に生体機能を予測的に適応させる、生命に必須の機能である。哺乳類の概日時計の中枢は視交叉上核であるが、全身の細胞でリズムを刻んでおり、個体発生に伴って形成されてくることが知られている。これまで、概日時計が中枢組織である視交叉上核のみならず、線維芽細胞などの細胞レベルにも存在することを示した（Yagita et al, Science, 2001）。さらに、細胞レベルの概日時計が細胞分化と共役することを明らかにし（Yagita et al, PNAS,2010）、個体発生初期においては、概日時計振動のコアコンポーネントの働きが直接抑制されていることを明らかにしてきた（Umemura et al., PNAS, 2014, 2017）。

本共同研究において、概日時計振動が抑制されている発生初期において、その概日時計抑制機構の生物学的意義について検討を進めた。その結果、概日時計振動ネットワークの中枢を機能させると、秩序立った組織形成が破綻する可能性があることが示唆された（Umemura et al., bioRxiv, 2020）。これらのことから、通常は、概日時計は安定な生理機能制御システムであると考えられてきたが、個体発生においては概日時計のスイッチが ON/OFF されるような制御がなされ、その細胞に最適な時間情報を担うシステムが転換・制御されていることが考えられる。

○研究成果の公表

（発表論文）

Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Watanabe H, Kondoh G, Kageyama R, **Yagita K***.（2020）CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock oscillation in mouse embryonic organoids. ***bioRxiv*** 2020.10.30.362830; doi: https://doi.org/10.1101/2020.10.30.362830.

【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い、プロモーターの改変等により正しくカセット交換されたクローンを得ることができた。カセット交換できたクローンにおいて、T 細胞へ分化誘導させ、高いがん抗原特異的キラー活性を持つことを確認した。これまでは転写活性の高い Vβ20-1 遺伝子のプロモーターを、外来性に薬剤耐性遺伝子カセットの上流に挿入する形で内在性 TCRβ 遺伝子にノックインして来た。そこで、より生理的な転写制御状態を実現するために、内在性の Vβ20-1 遺伝子と D 遺伝子間の約 700kb を欠失させ、人工的 VDJ 再構成を起こした iPS 細胞でカセットのノックインを行った。その結果、V-D 間領域を欠失させた iPS 細胞を作製し、内在性 Vβ20-1 プロモーター下に薬剤耐性遺伝子カセットをノックインしたクローンを得ることができた。現在、それらのクローンを T 細胞へと分化誘導させている。

併行して未知のがん抗原を標的とする TCR 遺伝子の単離も試みた。具体的には、MHC ホモのカニクイザル由来の腫瘍細胞を MHC ヘテロのサルに移植し、腫瘍に浸潤した PD-1 陽性 T 細胞のシングルセルから TCRα 鎖とβ鎖の遺伝子をセットで多数単離した。そのうち出現頻度の高い TCR 遺伝子を、ヒト iPS 細胞から再生した T 細胞へレトロウイルスを用いて導入し、腫瘍細胞と共培養したところ、腫瘍細胞を殺傷できる TCR 遺伝子を複数同定することができた（論文投稿準備中）。この方法をヒトの腫瘍に応用するために、河本研において京大産婦人科から卵巣がんサンプルの提供を受け、腫瘍に浸潤する T 細胞のシングルセル RNA-Seq 解析を行い、TCR レパートア解析を行った。現在、出現頻度の高い TCR 遺伝子セットを人工合成し、レトロウイルスベクターへ挿入している。

◯研究成果の公表

（発表論文）

1. 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, Kawamoto H. Regeneration of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from iPSCs transduced with exogenous TCR genes. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**,19:250-260, 2020.
2. Terada K, Kondo K, Ishigaki H, Nagashima A, Satooka H, Nagano S, Masuda K, Kawamura T, Hirata T, Ogasawara K, Itoh Y, Kawamoto H, **Agata Y**. Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from

tumor-infiltrating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model.（論文投稿準備中）

（学会発表）

1. 寺田晃士、近藤遼平、永野誠治、前田卓也、増田喬子、河本 宏、**縣 保年**. ゲノム編集とカセット交換法を用いたがん抗原特異的 TCR 遺伝子導入法の開発 . 第 24 回 日本がん免疫学会総会（2020 年 10 月 8-9 日）
2. 寺田晃士、近藤健太、石垣宏仁、里岡大樹、永野誠治、増田喬子、平田多佳子、小笠原一誠、伊藤 靖、河本 宏、**縣 保年**. カニクイザルの腫瘍浸潤 T 細胞から腫瘍殺傷能を有する TCR 遺伝子を単離する . 第 24 回 日本がん免疫学会総会（2020 年 10 月 8-9 日）
3. **縣 保年**.「PD-1 研究における「点と点」～ iPS 細胞とカニクイザルを用いたがん免疫療法の開発」日本マイコプラズマ学会誌 特別講演（2020 年 10 月 15 日）
4. **縣 保年**.「iPS 細胞由来の再生 T 細胞とカニクイザルを用いたがん免疫療法の開発」第 5 回イムノロジーフォーラム奈良（2020 年 11 月 21 日）
5. 寺田晃士、近藤健太、永野誠治、増田喬子、河本 宏、**縣 保年**.“TCR カセット法 ” の開発：がん抗原特異的 TCR 遺伝子を内在性 TCR 遺伝子座へ効率よく導入できる iPS 細胞から細胞傷害性 T 細胞を再生する . 第 43 回 日本分子生物学年会（2020 年 12 月 2-4 日）
6. 寺田晃士、石垣宏仁、近藤健太、長嶋彩花、里岡大樹、永野誠治、増田喬子、川村晃久、河本宏、平田多佳子、小笠原一誠、伊藤 靖、**縣 保年**. カニクイザルの腫瘍拒絶モデルにおける腫瘍浸潤 T 細胞からの腫瘍殺傷能をもつ TCR 遺伝子の単離 . 第 43 回 日本分子生物学年会（2020 年 12 月 2-4 日）

【新規膜タンパクによる造血幹細胞制御機構の解明】

○研究代表者　東京大学医科学研究所附属病院・血液腫瘍内科　小沼　貴晶　助教

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　がん・幹細胞シグナル分野　伊藤　貴浩　教授

○研究経過及び研究成果

新規膜タンパクとして、テトラスパニン関連分子であるイムノグロブリンスーパーファミリーメンバー 8（IGSF8, EWI-2, CD316）は、インテグリンなどと結合して、テトラスパニンウェブ複合体を形成し、細胞の増殖や接着を制御している。申請者らは、Igsf8 のコンディショナルノックアウトマウスを解析することにより、正常造血幹細胞および白血病幹細胞での幹細胞制御機構を見出した。造血細胞特異的 Igsf8 欠損マウス（*Igsf8*$^{flox/flox}$*; Vav-Cre*）では、末梢血や骨髄の造血幹細胞、骨髄系前駆細胞、分化成熟細胞の数や割合にはほとんど影響しなかったが、造血幹細胞の競合的連続移植において、Igsf8 欠損造血幹細胞は、コントロールと比較して、末梢血キメリズムは低下したことから、Igsf8 の欠損は定常状態における正常造血には影響をおよぼさないが、造血幹細胞の増殖および再構築能に影響することを明らかにした。一方、Igsf8 のコンディショナルノックアウトマウスの造血幹前駆細胞に白血病融合遺伝子をレトロウイルスにより発現させ誘導されるマウス白血病モデルにおいて、Igsf8 欠損では、コロニー形成能の著明な低下や生存率の改善が認められた。白血病幹細胞の RNA シーケンスでは、Igsf8 の欠損が、Wnt/β カテニン経路やアポトーシス関連遺伝子の制御を介した白血病幹細胞の維持に重要であることが示された。以上、本研究では、伊藤貴浩教授

との共同研究により、新規膜タンパクである Igsf8 のコンディショナルノックアウトマウスを解析することで、造血幹細胞と白血病幹細胞の制御機構の相違点を明らかにした。

○研究成果の公表

（学会発表）

1. Koji Jimbo, Takaaki Konuma, Takahiro Ito, Yaeko Nakajima, Atsushi Iwama, Arinobu Tojo. Immunoglobulin superfamily member 8 is a critical regulator for myeloid leukemia. 口演 , 第 82 回日本血液学会学術集会　2020.10.9 － 11 京都（Virtual）
2. Koji Jimbo, Takaaki Konuma, Takahiro Ito, Yaeko Nakajima-Takagi, Atsushi Iwama, Arinobu Tojo. Immunoglobulin Superfamily Member 8 Is Indispensable for Myeloid Leukemia Via Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. Poster presentation, 62nd American Society of Hematology Annual Meeting 2020.12.5-8 San Diego（Virtual）

（論文発表）

Koji Jimbo, Yaeko Nakajima-Takagi, Takahiro Ito, Shuhei Koide, Yasuhito Nannya, Atsushi Iwama, Arinobu Tojo, Takaaki Konuma. Immunoglobulin superfamily member 8 maintains myeloid leukemia stem cells through inhibition of *β*-catenin degradation. ***Leukemia***. 2022 Apr 13.doi: 10.1038/s41375-022-01564-7

【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】

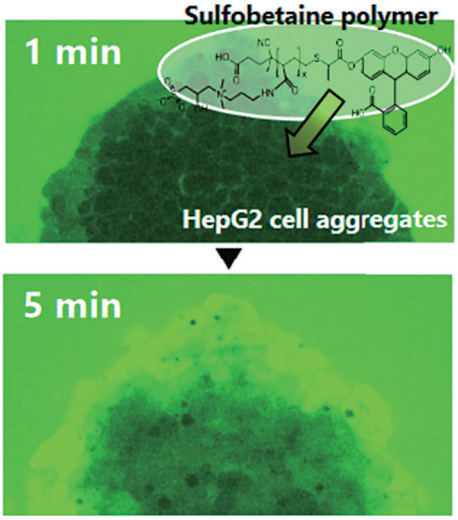
○研究代表者　東北大学大学院工学研究科　山本　雅哉　教授

○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：

分子デリバリーシステムとして、側鎖構造の異なる 2 種類のスルホベタインポリマーを合成した。合成したポリマーの末端を fluorescein-*O*-methacrylate を用いて蛍光修飾した。低タンパク質吸着 96 ウェルプレート内にヒト肝癌細胞（HepG2）、あるいはマウス頭蓋冠由来の株化骨芽細胞（MC3T3-E1）を 1500 cells/well で播種後、4 日間培養することにより細胞凝集体を作製した。得られたポリマーを終濃度 1 mg/mL となるように培養液へ添加後、高速共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を用いて細胞凝集体を経時的に観察し、得られた画像を OLYMPUS cellSens Dimension を用いて解析した。

右図に、HepG2 からなる細胞凝集体内部へのスルホベタインポリマーの移行挙動を、CLSM を用いて観察した結果を示す。CLSM 観察により、側鎖にヒドロキシ基をもつスルホベタインポリマーが、最も速い 5 分程度で細胞凝集体中心部まで移行することがわかった。また、細胞内での局在は観察されなかった。スルホベタインポリマーの細胞凝集体内移行では、ポリマー添加直後に細胞—細胞間接着部位へ浸透後、ポリマーの濃度勾配にしたがって細胞凝集体外部から中心部へと移行する初期挙動が確認された。さらに、ポリマー添加



図．スルホベタインポリマーの細胞凝集体内部移行挙動

40 分後、ポリマーは、細胞凝集体内全体の細胞内に分布していることがわかった。一方、コントロールとして、スルホ基を導入していないカチオン性ポリマーを用いたところ、1 時間内では細胞凝集体の最外部に位置する細胞へも移行できないことがわかった。これらの傾向は、用いた細胞に依存しなかった。

現在、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞などからなる細胞凝集体を作製し、様々な分化誘導後、細胞外環境が分子デリバリーシステムの浸透性に及ぼす影響について検討を続けている。

○研究成果の公表

（発表論文）

N. Morimoto, M. Yamamoto. Effective Permeation of Anticancer Drugs into Glioblastoma Spheroids via Conjugation with a Sulfobetaine Copolymer. *Biomacromol*., 21, 5044-5052（2020）.

【Optimization of experimental parameters of single-cell CRISPR screening in human pluripotent stem cells】

○研究代表者　Wellcome Sanger Institute　Leopold Parts　Group Leader

○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：

遊佐研究室においてヒト iPS 細胞を用いた 25 遺伝子 50gRNA のシングルセル CRISPR スクリーニングが実施された。ヒト iPS 細胞は、野生型 Cas9 を発現するもの（ゲノム DNA 切断が導入され遺伝子を破壊する）と転写抑制ドメイン融合型 dCas9 を発現するもの（転写抑制により遺伝子発現を抑制する）が作製され、それぞれシングルセル CRISPR スクリーニングが実施され、これらのデータの比較解析を行なった。まず、gRNA の標的遺伝子の発現を解析した結果、dCas9 システムでは多くの標的遺伝子に対して gRNA 導入後 2 日目までに明瞭な発現抑制が確認されたのに対し、wtCas9 システムでは 5 日目までの解析期間中、発現抑制ははっきりとは検出されたかった。次にトランスクリプトームに表現型が現れた遺伝子に対し、wtCas9 と dCas9 システムの間に差が生じるかどうか解析した。結果、データが取得できた gRNA 導入後、2、3、4 日後のいずれにおいても両システム間で大きな差は検出されず、むしろ時間経過がもたらす差の方が大きかった。次に、シングルセル CRISPR スクリーニングにおいて 1gRNA あたりの必要細胞数を調べるため 50% ダウンサンプルした解析データを作製し、統計解析を行なった。結果、発現量の高い遺伝子に対して、よく機能する gRNA が用いられた場合では半分の細胞数に減らしても統計的に不利にはならなかったものの、発現量の低い遺伝子や抑制効果の弱い gRNA の場合には有意差が検出できなくなった。以上のことから、シングルセル CRISPR スクリーニングにおいては dCas9 システムの優位性が明らかであり、また実験スケールは 1 gRNA あたり 100 細胞とするのが最適であることがわかった。今後のシングルセル CRISPR スクリーニングをデザインする上で貴重な情報を得ることができた。

○研究成果の公表

なし

【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】

○研究代表者　秋田大学医学部附属病院腎泌尿器科　嘉島　相輝　助教

○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

【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】

○研究代表者　東海大学健康学部　宮沢　正樹　講師

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　がん・幹細胞シグナル分野　伊藤　貴浩　教授

【遺伝子改変マウスを用いた多繊毛上皮細胞のアピカル秩序構築・再生原理の探索】

○研究代表者　大阪大学生命機能研究科　月田　早智子　特任教授

○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

【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】

○研究代表者　神戸大学　森垣　憲一　准教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　ナノバイオプロセス分野　笠井　倫志　助教

○研究経過及び研究成果：

細胞同士の接着により形成される厚さ数十ナノメートルの細胞間隙は、多様なシグナが伝達される細胞間コミュニケーションの場であり、細胞の組織化、再生、分化の制御に極めて重要な働きを担っている。本研究は、人工膜近傍に細胞間隙モデルを作製し分子の振る舞いを 1 分子レベルで詳しく調べることで、細胞間隙の分子機構、細胞間隙での相互作用を通じて細胞集団が組織化する仕組みを、解明・制御する新しい方法論を開発することを目的とした。

申請者が独自に開発したパターン化人工膜を用いて、厚さの制御されたナノ空間を形成し、その内部における膜タンパク質の挙動を定量的に解析する技術を開発した。パターン化人工膜は、ポリマー化された脂質二分子膜と生体膜と同等の脂質二分子膜が任意の形状でパターン化されており、安定なポリマー脂質膜は、組み込まれた生体脂質膜を安定化することができる。本研究では、生体脂質膜として細胞由来の膜小胞（blebs）を用いて、哺乳類細胞の膜タンパク質をパターン化人工膜に直接導入する技術を開発した。精神疾患に関わる重要な GPCR であるドーパミン受容体（D2R）を CHO 細胞に発現し薬剤処理で膜小胞を形成した。膜小胞をポリマー膜で囲まれた生体脂質膜部位に導入する効率は低かったが、高分子エラストマー（PDMS）とパターン化人工膜を接着させて形成されたナノ空間部位においては、膜小胞由来の D2R が高密度で導入され、分子が 2 次元拡散していることが観察された。D2R が生理的な活性を持つことは、アンタゴニストの結合や二量体形成寿命などで検証することができた。これらの結果を、論文として出版した（Nagai et al., 2021）。現在、人工膜と PDMS の間に厚さの制御されたナノ空間を開発中であり、今後、その内部において膜小胞由来の膜タンパク質を導入する手法を開発する。この技術が確立されれば、多様な膜タンパク質を人工膜とナノ空間において 1 分子計測して分子物性や機能を系統的に評価できるものと期待される。

2020 年度にはさらに、生細胞を人工膜表面に結合させる検討を開始した。細胞接着を誘起する配

列（RGD）を持ったペプチドをポリマー脂質膜に共有結合して提示し、パターン化人工膜表面にCHO 細胞を接着させた。CHO に発現した接着性 G タンパク質共役型受容体（CELSR）を 1 分子蛍光標識することで、CELSR が細胞接着にどのように関与するかを検証する予備実験を行った。RGDを認識して接着するインテグリンにおいては、ポリマー脂質膜表面に接着班が形成されたが、CELSR は RGD とは独立した動きを示した。この結果は、パターン化人工膜を用いて細胞接着の精密な検証が可能であることを示唆している。今後、CELSR を組み込んだパターン化人工膜と CELSR を発現した細胞を共培養することで、接着・認識作用が生じる仕組みの解明を目指す。

人工膜は、多様な膜タンパク質を脂質組成が制御された環境下で再構成、機能解析することが可能であり、今後、膜タンパク質評価チップとしての応用が期待される。また、本研究で開発を行った細胞間隙モデルを用いて、細胞間の分子相互作用を精密に再現・計測することで、再生医療にも応用可能な基盤技術を構築できるもの期待される。さらに、膜タンパク質、ナノ空間を有機的に連携した人工膜を用いて、病気の診断などにも用いることが可能なバイオチップの開発を進めたいと考えている。

○研究成果の公表

（学術論文）

Nagai R, Sugimachi A, Tanimoto Y, Suzuki KGN, Hayashi F, Weikert D, Gmeiner P, *Kasai RS, *Morigaki K. Functional Reconstitution of Dopamine D2 Receptor into a Supported Model Membrane in a Nanometric Confinement. ***Adv. Biol.***（***Weinh.***）. 2021 Dec;5（12）:e2100636. doi: 10.1002/adbi.202100636. Epub 2021 Nov 10. PMID: 34761565.（*Corresponding authors）

（学会発表）

1. Kenichi Morigaki,“Model biological membrane reconstituted in a nanometric space”, ACS Spring 2021, 2021 年 4 月 6 日（オンライン）（招待講演）
2. Rurika Nagai, Ayane Sugimachi, Yasushi Tanimoto, Kenichi G. N. Suzuki, Fumio Hayashi, Rinshi S. Kasai, Kenichi Morigaki, “Functional reconstitution of dopamine D2 receptor into a supported model membrane in a nanometric confinement”, ACS Spring 2021, 2021 年 4 月 6 日（オンライン）

【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　岡山大学医歯薬学総合研究科（医学系）　宝田　剛志　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

【炎症環境に対する骨髄造血適応を制御する転写後制御機構の解明】

○研究代表者　京都大学医学研究科　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

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点
2020 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2020 年 4 月～ 2021 年 3 月）

①霊長類 P3 感染実験

霊長類 P3 感染実験として計 4 件の研究を行った。

【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】

◯研究代表者：熊本大学大学院生命科学研究部 准教授 安永 純一朗
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授　三浦 智行
◯研究成果：

STLV-1 感染ニホンザル 3 頭に対し、抗 PD-1 抗体を 1 回量 3mg/kg を 2 週間間隔にて投与し、病態進行の有無および末梢血の採取、保存、解析を行った。抗 PD-1 抗体投与開始後、異常リンパ球の増加、リンパ節の腫大、皮疹の出現、呼吸状態の悪化など ATL 発症を疑う所見は得られなかった。プロウイルス量の経時的解析を行ったところ、投与前に最もウイルス量が高かった個体では、抗体投与後一過性のプロウイルス量の増加が観察された。現在、感染細胞クローナリティ、感染細胞の形質変化、免疫応答能について解析を進めている。

【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、技術専門職員　阪脇 廣美、教授　明里 宏文
◯研究成果：

R01 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、本ワクチンの SIV 特異的 CTL 細胞反応の選択的誘導を確認するとともに、感染防御効果を示す結果を蓄積した。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。

【アカゲザル iPS 細胞由来遺伝子改変 T 細胞の生体内評価】

◯研究代表者：京都大学 iPS 細胞研究所　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：

SHIV 感染防御能を付与した CCR5 homo ノックアウト iPS 細胞株（ΔCCR5 iPS 細胞）由来造血前駆細胞を SHIV 感染アカゲザルに骨髄内移植法による自家移植実験を行った。移植後 4 週の時点で、SHIV の plasm viral load の変化は認めないが、骨髄内に iPS 細胞由来の移植細胞の生着を認め、また iPS 由来細胞の自家移植による明らかな有害事象を認めることなく経過している。

【霊長類モデルを用いた HIV 根治療法の評価研究】

◯研究代表者：京都大学霊長類研究所　教授　明里 宏文

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授　三浦 智行

◯研究成果：

前年度までの研究により、HIV 持続感染カニクイザルにおいて当該 ART が HIV リザーバーサイズを顕著に低下させることを示した。そこで、HIV 特異免疫により機能的根治状態となっている HIV 潜伏感染ザルに ART を投与し、リンパ局所におけるリザーバーサイズへの影響について検討を行っている。また、これと平行してカニクイザルへの LRA 投薬実験を行い、薬物動態およびリンパ球活性化、炎症性サイトカイン応答に関するデータを収集している。

②マウス P3 感染実験

マウス P3 感染実験として計 2 件の研究を行った。

【ヒト化マウスモデルを用いたウイルス感染細胞のマルチオミクス解析】

◯研究代表者：東京大学医科学研究所感染症国際研究センター　准教授　佐藤 佳

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　小柳 義夫、特定研究員　三沢 尚子、
大学院生　小杉 優介

◯研究成果：

ヒト血液幹細胞移植ヒト化マウスへの GFP 発現 HIV-1 の接種実験における感染細胞の single-cell RNA-seq 発現解析を行い、GFP 陽性感染細胞は少なくとも 9 つの亜集団に分類されること、そして特に濾胞性 CD4 ＋ T 細胞群では HIV-1 と CXCL13 が共発現すること、インターフェロン誘導遺伝子群の発現量が低い細胞では HIV-1 が高発現することなどを見出した。すなわち、CD4 ＋ T 細胞群内で HIV-1 産生細胞には明確な多様性があることがわかった。

【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：

新規の潜伏感染モデルとしてウイルス潜伏と発現細胞を直接細胞レベルで解析した。ウイルスプロモータと細胞性プロモータを同時発現する HIV-1（デュアルレポータウイルス）を利用して、潜伏感染とウイルス発現細胞で特異的な遺伝子を転写開始点 RNA 解析法により見出した。その結果、PI3K/mTOR 経路が重要な役割を有することが示唆された。

③ウイルス・生命科学研究

ウイルス・生命科学研究として計 20 件の研究を行った。

【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】

◯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

【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】

◯研究代表者：同志社女子大学 薬学部　医療薬学科 特任助手 高橋 知里

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：助教　小田 裕香子

◯研究成果：

本研究では、タイトジャンクションを形成誘導する因子を質量分析により同定した。小田は、マウスの組織分泌液中にタイトジャンクションの形成を誘導する因子が存在することを見いだし、精製を行った。研究代表者の高橋は、プロテオミクス解析に精通しており、これまで多くの質量分析解析を行ってきた。高橋は小田にHPLCの操作やペプチドの扱い方などの技術指導を行うとともに、質量分析解析を行った。

【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　小曽戸 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、昨年度までに確立した実験系である EGTA 添加による Blastocyst への効率的細胞移植実験の最適化を行う計画であったが、COVID-19 の流行及びそれに伴う渡航・来所制限のため、当初計画の遂行が困難となった。そのため、共同研究の方向を修正し、現在までに行われた共同研究実験のデータ整理、更に追加的な共同研究として、ヒト iPS 細胞の HES1 遺伝子ノックダウンを行い、神経分化が促進されることを確認することに成功した。

【感染モデルにおける骨髄 NK 細胞の動態の解明】

◯研究代表者：大阪大学大学院医学系研究科　教授　石井 優

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　生田 宏一、助教　崔 広為、研究員　阿部 真也

◯研究成果：

ウイルス・再生医科学研究所の動物実験施設にて、CX3CR1-GFP マウスと Ncr1-Cre x R26R-tdTomato マウスを交配し、Ncr1-Cre x R26R-tdTomato x CX3CR1-GFP マウスを作出した。まず、このマウスの骨髄を大阪大学医学研究科で生体内イメージング解析したところ、赤色でラベルされた NK 細胞と緑色でラベルされた単球・樹状細胞が明確に検出された。今後、このマウスをウイルス再生研の 2 光子励起顕微鏡でも観察する計画である。

【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、技術専門員　宮地 均

○研究成果：

現在、申請者は 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 humanAKT1 を挿入したターゲティングベクター構築を試みている。野生型 hAKT1、活性型 myrAKT Δ PH、不活性化 hAKT1（3A: 179A, 308A, 483A）の C 末端側に HA タグを融合したコンストラクトを発現ベクターに挿入し、培養細胞レベルで発現の確認を行っている。今後 CRISPR-Cas9 によりノックインマウス作製をする。

【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 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 the efficiency of SeV vector transduction in CD34+ HSPC and determined the frequency of HPRT and CCR5 editing in CD34+ HSPC. We examined positive selection of HPRT-edited CD34+ HSPC with 6TG, and determined the frequency of off-target sites in CD34+ HSPC.

（*ccr5* と *hprt* 遺伝子同時編集用一過性 CRISPR/CAS9 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、*ccr5* と *hprt* それぞれに対する遺伝子編集効果を検討した。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とこの細胞における *hprt* と *ccr5* 遺伝子の編集頻度を検証した。また、CD34 陽性血液幹細胞における *hprt* 遺伝子編集ノックアウトによる 6TG に対する耐性獲得率とオフターゲット頻度を検証した。）

【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】

○研究代表者：大阪大学大学院生命機能研究科 助教　下條 博美

○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：

Neurog2 の異なる発現動態によって制御される下流遺伝子を明らかにするために、Neurog2 が異なる発現動態を示す様々な分化段階の神経前駆細胞の回収が終了した。今後、これらの細胞を用いて、抗 Neurog2 抗体を用いた ChIP-seq を行い、それぞれの細胞における Neurog2 が制御する下流遺伝子を明らかにし、動態の違いによって制御される遺伝子群の違いを明らかにする。

【ジリス内在性ボルナウイルス様配列の機能解析】

○研究代表者：大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座ウイルス学　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：

ボルナウイルスの感染伝播についてモデルを構築した。細胞間伝播についてモデルから計算したitEBLNによる抑制と、細胞内核酸合成についてモデルから計算した抑制では乖離があった。そのことから、itEBLNによるボルナウイルス複製阻害は、ウイルスの核酸合成の阻害に加え、それ以外のステップでも行われている可能性が示唆された。

【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】

○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：

S2P ホモログのペリプラズム領域に存在する PDZ タンデムのループに PA タグと呼ばれる配列を挿入した変異体を作製した。特に本研究では、この挿入配列の最適化を行うことで、S2P ホモログの立体構造が出来る限り維持された状態の変異体を作製した。そして、PA タグを特異的に認識する NZ-1 抗体の Fab 断片を結合させた複合体試料を調製し、電子顕微鏡解析を行うことで PDZ タンデムの空間配置の推定を行った。

【サル免疫細胞を持つマウスにおける SIV 感染病態の解析】

○研究代表者：京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻　准教授　伊吹 謙太郎

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授　三浦 智行

○研究成果：

SIVB670 株接種サル化マウスは、末梢血でのウイルス感染とそれに伴うサル CD4+T 細胞の減少及び CD8+T 細胞の増加を認めた。ウイルス接種後早期に発熱症状が認められたことから、剖検後、リンパ系組織におけるサイトカイン産生細胞について調べたところ、脾臓、小腸、子宮を除くすべての組織で IFN-γ 及び IL-6 産生細胞が検出され、そのほとんどは両サイトカインを同時に産生していた。また、脳内においては血管拡張が観察され、サイトカインによる炎症反応が起こっていることが示唆された。

【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 浄

○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：

SLOT 法に改良を加え最適化した「SLOT 法 2.0」を用いて、ラッサウイルスおよび SARS-CoV2 に対する高機能抗体の作成を試みたところ、ラッサウイルスに対する抗体を産生するハイブリドーマを 23 クローン、SARS-CoV2 については 16 クローンの取得に成功した。また、SARS-CoV2 の 16 クローンのうち、10 クローンについては中和活性があることを確認した。

【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】

○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：准教授　大塚 俊之
○研究成果：
新規に開発した光操作技術 PA-Tet ver.2 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 Ascl1 や 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。Ascl1 や 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。

【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】
○研究代表者：藤田医科大学総合医科学研究所 教授　前田 明
○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　大野 睦人、助教　谷口 一郎
○研究成果：
① ciRS-7 は、重要な機能をもつ環状 RNA（circRNA）であるが、MIR と名付けた繰り返し配列（SINE）が、その生合成経路に必須であることを示した。さらに MIR 依存的に産生される circRNA 群の存在を明らかにした。
② ISG20 と nuclear exosome が細胞内で 3’- プロセシング反応を担うかを次世代シーケンス法によって検証した結果、RNA 分解に関与することを明らかにした。

【エボラウイルスのヌクレオカプシド輸送機序の解明】
○研究代表者：国立感染症研究所ウイルス I 部　主任研究官　髙松 由基
○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：
本研究では前駆研究で構築した非感染性ライブセルイメージングシステムを用いて、EBOV の NCLS の形成・輸送に必須である 3 つのウイルスタンパク質（NP, VP35, VP24）について、それぞれの輸送機能を担うドメイン・アミノ酸モチーフを同定することを目指した。本年度は VP24 タンパク質について、細胞内の小胞輸送を担うペプチドモチーフ（L ドメイン）に注目して解析を進めた。そして VP24 の YxxL モチーフが、NCLS 輸送で重要な役割を担うことを解明し、国際誌に発表した。

【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】
○研究代表者：京都大学農学研究科　教授　松浦 健二
○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授　宮沢 孝幸

【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：

アレナウイルスのプロトタイプウイルスであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）の Z を用いて、その多量体化をモニターし、かつハイスループットスクリーニングに適した FRET プローブ：Zabton を開発した。今年度は、Zabton を用いた化合物スクリーニングから得たヒット化合物の内 1 つが、有意な抗 LCMV 効果を発揮することがわかり、プローブ開発から化合物取得までの一連の研究成果を Cell Structure and Function 誌にて発表した。

【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】

○研究代表者：群馬大学大学院医学系研究科生体防御学　教授　神谷 亘
○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：

細菌性人工染色体（BAC）を用いて新型コロナウイルスの組換え系を確立するとともに、新型コロナウイルスの RNA レプリコンを作製し、新型コロナウイルスの病原性の解析に供するとともに、抗ウイルス薬スクリーニングへの応用を行った。

【大腸菌 BepA の機能制御機構の解析】

○研究代表者：山形県立米沢栄養大学健康栄養学部　教授　成田 新一郎
○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　秋山 芳展、研究員　大門 康志
○研究成果：

BepA の His-246 残基の役割を明らかにするために、本残基に変異を導入し、変異型 BepA の機能を調べた。その結果、これらの変異体では、BepA のプロテアーゼ活性が昂進しており、通常は分解しない、正常な生合成経路にある基質外膜タンパク質（LptD）をも分解することが分かった。His-246 残基は、BepA のプロテアーゼ機能の ON/OFF に関わるスイッチとして働くものと考えられる。

【COVID-19 に対する治療法の開発】

○研究代表者：熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター　教授　松下 修三

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　小柳 義夫、助教　志村 和也

◯研究成果：

COVID-19 患者の末梢血 B 細胞より抗体遺伝子を抽出し、SARS-CoV-2 の S タンパク質特異的抗体遺伝子を単離した。陽性抗体の中からウイルス中和抗体を単離した。

2021 年度共同研究課題一覧

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点

研究代表者	ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者	研究課題名
和歌山県立医科大学医学部分子遺伝学講座 井上　徳光　教授	幹細胞遺伝学分野 遊佐　宏介　教授	乳酸シグナル伝達経路の解明
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Professor Dominik N. Müller	幹細胞遺伝学分野 遊佐　宏介　教授	Elucidation of the molecular principle underlying the cellular sodium responses related to proinflammatory M1 macrophage function by genome-scale CRISPR knockout screening.
近畿大学医学部再生機能医学講座 高藤　義正　助教	生体材料学分野 田畑　泰彦　教授	骨格筋由来細胞外小胞の骨再生メカニズムの解明
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	細胞分化と共役する概日時計の組織形成における意義
大阪大学大学院生命機能研究科 立花　誠　教授	幹細胞遺伝学分野 遊佐　宏介　教授	マウス単一エキソン型性決定因子 SRY-S 分解機構の解明
獨協医科大学先端医科学研究センター生体防御研究部門 若尾　宏　教授	再生免疫学分野 河本　宏　教授	がん免疫における MAIT 細胞の機能解明
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	常在収縮力計測による多能性幹細胞の分化状態評価
東京大学医科学研究所遺伝子細胞治療センター分子遺伝医学分野 恒川　雄二　助教	幹細胞遺伝学分野 遊佐　宏介　教授	微小エマルジョン内細胞培養による超並列 AAV 産生細胞スクリーニング技術の開発
東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座整形外科学 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
産業技術総合研究所健康医工学研究部門 森川　久未　研究員	附属ヒト ES 細胞研究センター 末盛　博文　准教授	光操作技術を用いたヒト心臓の発生と拍動制御機構の解明
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 田畑　泰彦　教授	細胞外環境操作による幹細胞凝集体に対する分子デリバリーシステムの組織浸透性機構解明
立命館大学生命科学部 吉澤　拓也　助教	がん・幹細胞シグナル分野 服部　鮎奈　准教授	幹細胞分化に関わる RNA 結合タンパク質の相分離性解析
広島大学統合生命科学研究科 高橋　治子　助教	発生システム制御分野 永樂　元次　教授	生体外 3 次元筋・腱複合組織の作製と筋―腱接合部形成・成熟過程の解明 ―組織内の細胞配向を可能にする 3 次元細胞培養材料の活用―
Helsinki Institute of Life Science University of Helsinki Professor Sara Wickström	バイオメカニクス分野 安達　泰治　教授	Principles of chromatin nanomechanical dynamics and its role in transcription and stem cell identity
秋田大学医学部附属病院泌尿器科 嘉島　相輝　助教	再生免疫学分野 河本　宏　教授	生体内追跡システムを備えた iPS 細胞由 CAR-T 細胞療法の開発

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（医） 宝田　剛　教授	組織再生応用分野 戸口田　淳也　教授	PRRX^{+} 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解
広島大学大学院医系科学研究科 宿南　知佐　教授	バイオメカニクス分野 安達　泰治　教授	筋・腱・靱帯によって制御される下顎骨成長のバイオメカニクスの解明
東京大学大学院薬学系研究科 堀　昌平　教授	統合生体プロセス分野 廣田　圭司　准教授	制御性 T 細胞療法に向けた Foxp3 エピゲノムレポーターマウスの作製と運命マッピング解析
大阪大学大学院生命機能研究科 長澤　丘司　教授	統合生体プロセス分野 近藤　玄　教授	造血幹・前駆細胞ニッチの変質と再生を制御する分子機構の解明
大阪大学歯学部附属病院口腔外科 1（制御系） 磯村　恵美子　講師	生体材料学分野 田畑　泰彦　教授	幹細胞―細胞増殖因子徐放性足場の移植と筋負荷を併用した筋組織再生の試み
熊本大学生命資源研究・支援センター 竹尾　透　教授	附属再生実験動物施設 渡邊　仁美　助教	受精適期における精子選別機構の解明
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	（課題名公表不可）
大阪大学 生命機能研究科 月田　早智子　教授 （帝京大学戦略的イノベーション研究センター 兼任）	統合生体プロセス分野 近藤　玄　教授	遺伝子改変マウスを用いた皮膚付属器におけるタイトジャンクションの役割の理解
滋賀医科大学生化学・分子生物学講座 縣　保年　教授	再生免疫学分野 河本　宏　教授	iPS 細胞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
INSERM MONTPELLIER CANCER RESEARCH INSTITUTE Dr. Andrei Turtoi, Team Leader “Tumor Microenvironment and Therapy Resistance”	がん・幹細胞シグナル分野 伊藤　貴浩　教授	Towards the Understanding of Individual Roles of Different CAF Populations in the Progression of Human Hepatocellular Carcinoma

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点

① 新型コロナウイルス研究

研究代表者	ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者	研究課題名
京都大学 iPS 細胞研究所 高山　和雄　講師	微細構造ウイルス学分野 野田　岳志　教授	ヒト iPS 細胞における SARS-CoV-2 感染・複製能の評価
京都大学医学研究科免疫細胞生物学 上野　英樹　教授	ウイルス制御分野 橋口　隆生　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	新型コロナウイルス特異的免疫応答解析
北海道大学大学院薬学研究院 前仲　勝実　教授	ウイルス制御分野 橋口　隆生　教授	SARS-CoV-2 蛋白質の性状解析と感染阻害抗体の開発
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 微細構造ウイルス学分野 野田　岳志　教授 システムウイルス学分野 志村　和也　助教	新型コロナウイルスに対する中和抗体の解析

大阪急性期・総合医療センター精神科 松永　秀典　主任部長	RNA ウイルス分野 朝長　啓造　教授 牧野　晶子　助教	SARS-CoV-2 に対する抗体測定を用いた COVID-19 の病態評価
群馬大学医学系研究科生体防御学 神谷　亘　教授	RNA ウイルス分野 朝長　啓造　教授 牧野　晶子　助教	組換え低病原性コロナウイルスを用いた新型コロナウイルスに対するワクチン開発
京都大学医学研究科 長尾　美紀　教授	RNA ウイルス分野 朝長　啓造　教授 牧野　晶子　助教	新型コロナウイルス感染症の疫学・臨床像の解析と検査法の検討
京都大学 iPS 細胞研究所 齊藤　博英　教授	RNA ウイルス分野 朝長　啓造　教授 牧野　晶子　助教	新規 RNA スイッチによるウイルス由来分子の検出および新規治療薬の開発
京都大学医学研究科 大森　孝一　教授	RNA ウイルス分野 朝長　啓造　教授 牧野　晶子　助教	COVID-19 治療薬開発のためのヒト気道細胞移植動物を用いた評価システムの開発
京都大学医学研究科 後藤　慎平　特定准教授	微細構造ウイルス学分野 野田　岳志　教授	気道・肺胞上皮を用いた抗新型コロナウイルス薬の探索と同定

② ウイルス解析研究

国立感染症研究所感染病理部 宮本　翔　非常勤研究員	微細構造ウイルス学分野 野田　岳志　教授 中野　雅博　助教	インフルエンザウイルスの核内複製機構の解明
国立感染症研究所エイズ研究センター 俣野　哲朗　センター長	霊長類モデル分野 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　技術専門職員 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
京都大学霊長類研究所 明里　宏文　教授	霊長類モデル分野 三浦　智行　准教授	霊長類モデルを用いた HIV 根治療法の評価研究
京都大学 iPS 細胞研究所 金子　新　教授	霊長類モデル分野 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
長崎大学感染症共同研究拠点 南保　明日香　教授	微細構造ウイルス学分野 野田　岳志　教授	革新的顕微鏡技術を用いたエボラウイルス粒子形成に伴う生体膜動態の微細構造解析
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 本田　知之　教授	RNA ウイルス分野 朝長　啓造　教授	DNA 損傷修復系と RNA ウイルスとの相互作用の解析
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　特定研究員	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
国立感染症研究所ウイルス I 部 髙松　由基　主任研究官	微細構造ウイルス学分野 野田　岳志　教授	フィロウイルスのヌクレオカプシド輸送機構の解明

③ 最先端生命科学研究

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 岡部　泰賢　特任准教授	幹細胞デコンストラクション分野 今吉　格　教授 附属感染症モデル研究センター 宮地　均　技術専門員 北野　さつき　技術専門職員	マクロファージの組織発生機構の解明
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 奥野　浩行　教授	幹細胞デコンストラクション分野 今吉　格　教授	成体神経新生による大脳認知機能調節機構の解明
京都大学大学院医学研究科 野村　紀通　准教授	微細構造ウイルス学分野 野田　岳志　教授	クライオ電子顕微鏡を用いたB型肝炎ウイルス侵入受容体の精密立体構造解析
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	複合的手法による細菌型S2Pの立体構造解析
京都大学医学研究科人間健康科学系専攻 伊吹　謙太郎　准教授	霊長類モデル分野 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
京都大学生命科学研究科 高原　和彦　准教授	免疫制御分野 生田　宏一　教授 崔　広為　助教 阿部　真也　研究員 旭　拓真　大学院生	レクチン分子による免疫制御と自然免疫系T細胞分化における働き
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 大塚　俊之　准教授（～2021年9月） 幹細胞デコンストラクション分野 今吉　格　教授（2021年10月～）	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
長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 阪上　起世　助教	増殖制御システム分野 大塚　俊之　准教授（～2021年9月） 小林　妙子　助教（～2021年6月） 幹細胞デコンストラクション分野 今吉　格　教授（2021年10月～） 生体物性学分野 影山　龍一郎　客員教授 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
RIKEN Center for Integrative Medical Sciences PARRISH, Nicholas Fredric, Genome Immunobiology RIKEN Hakubi Research Team Leader	RNAウイルス分野 朝長　啓造　教授	A CRISPR-based reporter of Borna disease virus RNA-to-RNA, virus-to-host gene flow
自然科学研究機構生命創成探究センター / 基礎生物学研究所 青木　一洋　教授	数理生物学分野 望月　敦史　教授	構造理論と光遺伝学を用いた細胞周期ネットワークの統合的理解

学術集会

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
「ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点」
令和２年度共同研究報告会

開 催 日：2021 年 3 月 19 日（金）
開催方法：ZOOM によるオンライン開催

開会挨拶　所長　小柳　義夫（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）
「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」　安永　純一朗　准教授（熊本大学大学院生命科学研究部）
「アカゲザル iPS 細胞由来遺伝子改変 T 細胞の生体内評価」　金子　新　教授（京都大学 iPS 細胞研究所）
「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」
佐藤　佳　准教授（東京大学医科学研究所感染症国際研究センター）
「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」神谷　亘　教授（群馬大学大学院医学系研究科生体防御学）
「大腸菌 BepA の機能制御機構の解析」　成田　新一郎　教授（山形県立米沢栄養大学・健康栄養学部）
「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」　高藤　義正　助教（近畿大学医学部再生機能医学講座）
「Studies of Cellular Mechanotransduction Pathways from Extracellular Matrix to the Nucleus
力学的過負荷に対する骨細胞の NO 応答とアポトーシスとの関連」
Mohammad R. K.Mofrad Professor（University of California Berkeley）（発表者：バイオメカニクス分野博士課程　仲尾信彦）
「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」
池川　志郎　チームリーダー（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）
「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」
平谷　伊智朗　チームリーダー（国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター）
「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」
川内　大輔　室長（国立精神・神経医療研究センター・病態生化学研究部）
「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」
田中　栄　教授（東京大学大学院医学系研究科外科学専攻感覚・運動機能医学講座整形外科学）
（発表者：バイオメカニクス分野研究員　金英寛）
「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」　長澤　丘司　教授（大阪大学大学院生命機能研究科）
「組織形成における概日時計成立の生物学的意義」　八木田　和弘　教授（京都府立医科大学大学院医学研究科）
「iPS 細胞とゲノム編集を用いた効率のよいがん抗原特異的キラー T 細胞の再生」
縣　保年　教授（滋賀医科大学生化学分子生物学講座）
「新規膜タンパクによる造血幹細胞制御機構の解明」　小沼　貴晶　助教（東京大学医科学研究所附属病院・血液腫瘍内科）
「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」
宮沢　正樹　講師（東海大学健康学部健康マネジメント学科）
「遺伝子改変マウスを用いた多繊毛上皮細胞のアピカル秩序構築・再生原理の探索」
月田　早智子　特任教授（大阪大学大学院生命機能研究科）
「PRRX1^{+} 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解」　宝田　剛志　独立准教授（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）
「炎症環境に対する骨髄造血適応を制御する転写後制御機構の解明」　竹内　理　教授（京都大学大学院医学研究科）
「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」
山本　雅哉　教授（東北大学大学院工学研究科）

「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」

嘉島　相輝　助教（秋田大学医学部附属病院腎泌尿器科）

「Optimization of experimental parameters of single-cell CRISPR screening in human pluripotent stem cells」

Leopold　Parts　Group Leader（Wellcome Sanger Institute）

「Fitness gene profiling in chemically reprogrammed hepatic precursor cells」

Keisuke　Kaji　Professor（MRC Centre for Regenerative Medicine University of Edinburgh）

「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」

森垣　憲一　准教授（神戸大学バイオシグナル総合研究センター）

ウイルス・再生医科学研究所　第 15 回公開講演会

開 催 日：2021 年 7 月 17 日（土）

開催方法：オンライン開催 ZOOM ウェビナー

開会挨拶

「新型コロナウイルスは細胞でどのように増えるのか？」　野田　岳志（ウイルス・再生医科学研究所　教授）

「新型コロナと免疫：どうして子供は罹りにくい？ワクチンの仕組みは？」　河本　宏（ウイルス・再生医科学研究所副所長　教授）

分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演　　題	主催分野
2021. 2. 3	瓜生　耕一郎 （金沢大学 理工研究域 生命理工学系）	概日時計の位相応答： 二重ネガティブフィードバックループの機能分化と dead zone 形成	数理生物学
2021. 2.19	金　英寛 （京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 東京大学整形外科）	細胞動態に基づく骨粗鬆症治療効果の in silico 解析	バイオメカニクス
2021. 2.19	Jeonghyun Kim （京都大学 ウイルス・再生医科学研究所）	3 次元培養モデルによる骨細胞分化誘導の研究	バイオメカニクス
2021. 3.12	沖川　沙佑美 （藤田医科大学 神経行動薬理学研究部門／名古屋大学 細胞薬効解析学分野）	Cell type - and layer - specific convergence in core and shell neurons of the dorsal lateral geniculate nucleus	がん・幹細胞シグナル
2021. 4.19	浦田　秀造 （長崎大学 感染症共同研究拠点）	ウイルス粒子形成阻害化合物の作用機序の解析	微細構造ウイルス学
2021. 4.19	古山　若呼 （長崎大学 感染症共同研究拠点）	エボラウイルス sGP の機能解析	微細構造ウイルス学
2021. 4.19	南保　明日香 （長崎大学 感染症共同研究拠点）	形質膜リモデリングを介したエボラウイルス粒子形成機構の解明	微細構造ウイルス学
2021. 4.19	高松　由基 （国立感染症研究所）	高病原性ウイルスのライブセルイメージングと構造解析への応用	微細構造ウイルス学
2021.10.13	Andrei Turtoi （Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier Inserm U1194 – Université Montpellier Institut du Cancer de Montpellier Tumor Microenvironment and Resistance to Treatment Lab）	Unveiling the Architecture of Breast Cancer Using Spatial Transcriptomics	がん・幹細胞シグナル
2021.11.22	岡田　崇 （理化学研究所 iTHEMS）	時系列解析が明らかにする季節性インフルエンザの進化	発生システム制御
2021.12.14	Qian Yu （Dept. Comp. Biol. Med. Sci., Grad. Sch. Front. Sci., Univ. Tokyo）	Mathematical Modeling of Drug Resistance Evolution and The Optimal Treatment Strategy in EGFR mutated Lung Cancer	数理生物学
2021.12.15	Taeyoon Kim （Weldon School of Biomedical Engineering, Purdue University/ Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University）	My Journey in Biomechanics and in Japan	バイオメカニクス

構成員名簿

（2022 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（帝京大学先端総合研究機構教授）
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・生命科学先端融合的共同研究拠点＞

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 霊長類医科学研究センターセンター長）
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）
橋　口　隆　生（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（帝京大学先端総合研究機構教授）
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　　助教：鈴木干城

＜ RNA ウイルス分野＞

教授：朝長啓造　　助教：牧野晶子

特定職員：山下はるか　　研究員（非常勤）：小森園亮，酒井まどか

大学院生：向井八尋，神田雄大，川崎純菜，Lin, Hsien Hen，岩田美智子，鍋加有佑

研究生：曽我玲子　　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：廣瀬奈々美，角田優伍，藤田陽子，梶川純一，祝部和也，胡　上帆，張　子涵，野田隆斗

山内康司，宇治彰人

＜がんウイルス分野　酒井Ｇ＞

准教授：酒井博幸　　技術補佐員：坂田祥馬

＜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：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

＜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，大平慶蔵，岡本麻弥

共同研究者：谷一靖江，高原和彦，榛葉旭恒，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：袁　熙敏　　研究生：服部德哉　　研修員：法邑賢一

＜生体材料学分野＞

教授：田畑泰彦　　助教：安藤　満

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：雲財　知，池之谷知佳

大学院生：上本祐介，鈴木久美子，古根川靖，田畑琢也，阿部哲士，竹花　祥，鷲坂太一，堀下駿太，井上侑香，

Gao Linn，Yang Wenxuan，中村直人　　研究生：鈴木貴久

学部生：岡本颯真，南光太郎，橋本磨熙

研究員（民間等共同研究員）：松野久美子，下農健治，山本勝徳，梶原竜太，アンドレイア デトレド，山本真史，古川秀樹

研究員（受託研究員）：木村幸史，大室純子，佐久間洸平，黒田龍郎，田中建伎，葛島　穣

共同研究者：藤本洋平，安部友大

＜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：上堀淳二，永野誠治，小林由佳

特定研究員：長畑洋佑，加藤雄真，宮崎和子，西村有史，岸本加恵，小西理予，原田綾乃，依田真由子

非常勤研究員：渡邊　武　　事務補佐員：中宮真梨恵，宮武明子

派遣職員：白数いずみ，野口友里亜　　大学院生：板原多勇，高　宇嫻，貝谷亮太

特別研究学生：古谷竜男，Don Pietro Saldajeno　　共同研究者：嘉島　相輝　　民間等共同研究員：瀬和敬子

＜再生増殖制御学分野　（再生免疫学分野内）＞

連携教授：瀬原淳子　　事務補佐員：渡邉祐子

＜組織再生応用分野＞

教授：戸口田淳也　　助教：金　永輝

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，中武誠真，福田真幸

派遣職員（事務補佐員）：稲場知愛　　大学院生：孫　麗萍，馬　璟純

研究員（非常勤）：鎌倉武史，川井俊介（CiRA）　　共同研究者：水品善之

＜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　　共同研究者：細川美穂子　　研究員（非常勤）：林　瑛理

教務補佐員：酒井睦美　　大学院生：李　京航，高野友篤

＜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，藤本七恵，李　顕　　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＞

客員教授：影山龍一郎　　特定助教：磯村彰宏

教務補佐員：福井　雅弘　　技術補佐員：大西　翔　　事務補佐員：吉田しのぶ

大学院生：朴　文惠，Jia Xueqi，木下晃

共同研究者：前田勇樹，貝瀬　峻，岡本志央

外国人共同研究者：Ana Fernandes

＜再生医工学分野＞

（欠員中）

■生命システム研究部門■

＜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

研究員：須長純子，金　英寛　　事務補佐員：平良美智代，森山友紀恵

大学院生：安藤悠太，仲尾信彦，木部善清，横山優花，福手淳平，藤本航成，山口嵩洋，山口大輝，Aizat bin MOHD AMINUDDIN，河﨑貴哉，福田晃子，吉本昴希，末竹崇志，澤田剛，鈴木龍之介，竹本祐也，直原舞子，宅　雄大

学部生：井上立貴，大久保遼太郎，岡　康平，杉本浩太郎，瀧川光輝，花谷一圭，増山　諒，武藤剛嗣

＜発生システム制御分野＞

教授：永樂元次　　准教授：大串雅俊　　助教：瀬戸裕介　　連携研究員：堤　璃水　　民間等共同研究員：黒田貴雄，上杉佳子

共同研究員：田宮寛之　　大学院生：WANG ZHE，HAO RUOLIN，橋本みなみ，吉村安寧，各務将矢，羽田早織，山口雄大

学部生：小田裕介，熊谷曹世，中野玲衣

＜システムウイルス学分野＞

教授：小柳義夫　　講師：Alexis Vandenbon

特定研究員：三沢尚子　　大学院生：麻生啓文，小杉優介

＜増殖制御システム分野＞

（欠員中）

＜ RNA システム分野＞

助教：北畠　真，谷口一郎

＜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

技術補佐員：小柴里美　　技能補佐員：椎葉健伸，寒蝉龍朗

大学院生：三宅拓也，横山達彦，田中雄太，古味大雄，中込悠輔，小林達也，池田優希

＜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，一條　遼　　特定助教：小林芳彦

技術補佐員：木曽和美，浦田悠子，牧　律子，吉川万紀　　事務補佐員：原田洋子

大学院生：阿部浩太　　研究員：上月智司　　研究生：朴　龍鶴

＜数理生物学分野＞

教授：望月敦史　　准教授：立川正志　　研究員：山内悠平，船越昌史　　事務補佐員：矢延聡枝　　大学院生：菱田温規

＜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　　特定助教：川村文彦　　研究員：竹田潤二

教務補佐員：杉野成一　　事務補佐員：大段有美子

＜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，沖川沙祐美

教務補佐員：森部江美子　事務補佐員：渡邉祐子　派遣職員（技術補佐員）：柳沢誠，赤井絹香

派遣職員（事務補佐員）：片岡みわこ　　オフィスアシスタント：塩津航大

大学院生：王　若冲，安井ワトソン理央，黒田逸月，中野隆斗，山本佳輝

＜幹細胞デコンストラクション分野＞

教授：今吉格　特定教授：磯部圭佑（生命科学研究科）准教授：GUY Adam（生命科学研究科）

特定准教授：坂本雅行（生命科学研究科）　講師：山田真弓（生命科学研究科）　助教：鈴木裕輔（生命科学研究科）

研究員：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），

加藤悠（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），YANG Seongchun（生命科学研究科），

SHAKLEINA Polina（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），

石原将吾（生命科学研究科），井出暁子（生命科学研究科），行天悠一郎（生命科学研究科），福田智徳（生命科学研究科），

見里朝史（生命科学研究科），山本亮良（生命科学研究科），八木さくら（生命科学研究科）

研究生：Alaa Jad（生命科学研究科）

＜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：呉　成旭，竹内文彦　　技術補佐員：小柴里美，白坂勇太郎

大学院生：Emralino Francine Lianne，Saikruang Wilaiporn，IM Junghyun，ZUO Wenjie　　研究生：李　受玫

共同研究者：船曳正英，鬼澤秀夫，山田辰太郎，大音泰介

■附属感染症モデル研究センター■

センター長（兼）：朝長啓造

＜霊長類モデル分野＞

准教授：三浦智行　　研究員：松浦嘉奈子，YALÇIN PISIL　　特定研究員：島崎奈津子

教務補佐員：大附　舞

大学院生：徐　可婧，張　原銘，王　梓涵，趙　庚鶴　　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　　技術補佐員：辻　薫　　教務補佐員：岩本由美子　　事務補佐員：和田晶子

大学院生：TAN Wei Keat, Poonam, KOVBA Anastasiia, Abeer Mohamed Ali Mohamed Kesha, Maureen Kidiga

オフィスアシスタント：久保田結子

＜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，庄司日和，内藤はづき　　技術補佐員：正玄裕子

共同研究者：田中　淳

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（兼）：廣田圭司　　助教：渡邊仁美　　技術専門職員：出口央士

技術職員：渋谷　翔，俣野真帆　　教務補佐員：竹明フサ

技能補佐員：向　一哲，川北美奈子，高溝一郎，藤堂詩子，柴山厚子

研究支援推進員：古卿智英，佐々木勉，吉田美保，富士原達美，新　謙一，佐治佑沙

事務補佐員：北澤志津江　　派遣職員：西山尚之，片山龍一，竹内　宏

■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，川瀬栄八郎　　特定職員：高田　圭　　事務補佐員：廣富ひとみ　　派遣職員：古田昌代，藤井麻衣

・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），遊佐宏介（兼）　　准教授：大串雅俊（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：原　彰子　　主任：畠中あい　　掛員：安本理恵　　技術職員：尾形幸亮

再雇用職員：小林英治　　教務補佐員：釆女久実子　　派遣職員：谷山佳奈美，稲垣きよみ，中村　望

Annual Report
of the Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University
Vol.6 2021

2022 年 12 月 1 日　発行
京都大学医生物学研究所
（2022 年 4 月 1 日にウイルス・再生医科学研究所から改称しました）

Institute for Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University