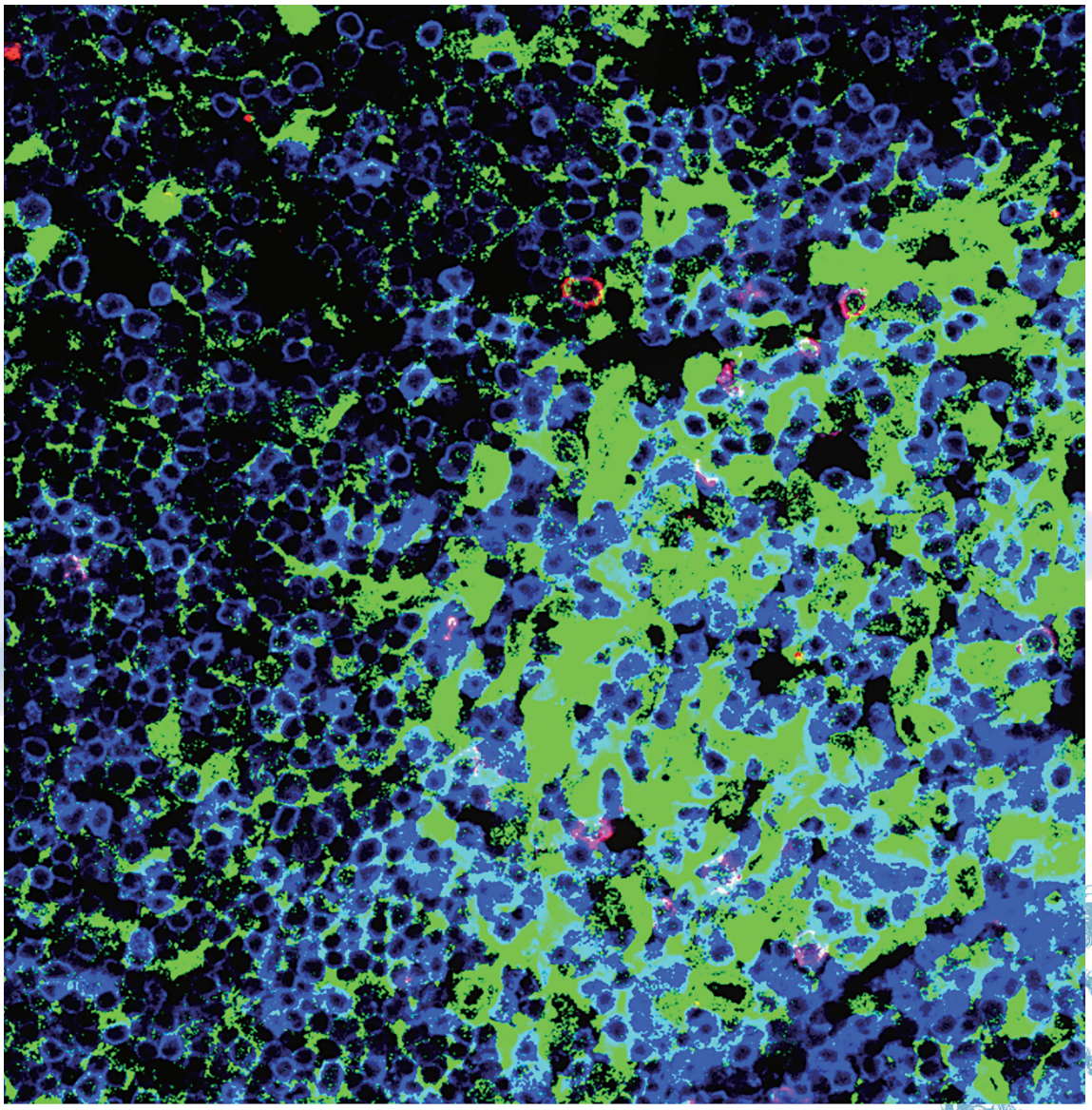
ISSN 2433-2593

LiMe
医生物学研究所

Annual Report

of the Institute for
Life and Medical Sciences
Kyoto University Vol. 7 2022



京都大学医生物学研究所年報

Annual Report
of the Institute for Life and Medical Sciences

Vol.7 2022

Institute for Life and Medical Sciences
Kyoto University

表紙：
マウス胸腺の免疫蛍光染色画像。サイトカイン IL-15 を産生する髄質胸腺上皮細胞（緑）に近接して、iNKT 細胞（マゼンタ）が存在する。αβ T 細胞（青）。

Cover:
Immunofluorescence image of mouse thymus. iNKT cells (magenta) are localized near IL-15-producing medullary thymic epithelial cells (green). αβ T cells (blue).

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 …… 11
がんウイルス分野 Laboratory of Tumor Viruses …… 17
細胞制御分野 Laboratory of Cell Regulation …… 20
免疫制御分野 Laboratory of Immune Regulation …… 24

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 …… 29
生体材料学分野 Laboratory of Biomaterials …… 31
再生免疫学分野 Laboratory of Immunology …… 42
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） …… 50
臓器連関研究チーム Inter-Organ Communication Research Team …… 52
組織再生応用分野 Laboratory of Tissue Regeneration …… 56
発生エピゲノム分野 Laboratory of Developmental Epigenome …… 61
統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science …… 63
病因免疫学分野 Laboratory of Immunopathogenesis …… 67
生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology …… 70

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 …… 77
発生システム制御分野 Laboratory of Developmental Systems …… 88
RNA システム分野 Laboratory of RNA System …… 92
生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System …… 95
組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis …… 101
数理生物学分野 Laboratory of Mathematical Biology …… 107
幹細胞遺伝学分野 Laboratory of Stem Cell Genetics …… 111
がん・幹細胞シグナル分野 Laboratory of Cell Fate Dynamics and Therapeutics …… 117
幹細胞デコンストラクション分野 Laboratory of Deconstruction of Stem Cells …… 124
情報制御分野 Laboratory of Regulatory Information …… 127

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 …… 129
ウイルス共進化分野 Laboratory of Virus-Host Coevolution …… 132
マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team …… 136

附属再生実験動物施設 Center for Animal Experiments …… 138

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 …… 141

共同研究 …… 145

学術集会 …… 174

分野主催のセミナー …… 176

構成員名簿 …… 178

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
助　教	佐藤　裕真	Assist. Prof.	Yuma Sato
助　教	木村香菜子	Assist. Prof.	Kanako Kimura

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。2022 年においては、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）変異株による ACE2 受容体認識と中和抗体逃避のバランス変化について、その構造基盤を明らかにした。また、SARS-CoV-2 に対するワクチン抗原や感染阻害剤、広域中和抗体の開発・作用機序解明に成功した。

1）SARS-CoV-2 に対する創薬研究

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。2022 年においては、SARS-CoV-2 に対する広域中和抗体の作用機序を解明するため、SARS-CoV-2 S 蛋白質と広域中和抗体の複合体構造解析を実施した。変異株のアルファ、ベータ、ガンマ、デルタ等に対して中和能を示す UT28K 抗体の作用機序を決定するために構造解析を行った（**Fig. 1**）。その結果、SARS-CoV-2 S 蛋白質 RBD（Receptor binding domain）の F486 周辺を、アミノ酸主鎖を多く認識して側鎖認識を低減することで広域中和能を示すことが明らかとなった。その他、複数の広域中和抗体の作用機序解明を進めた。また、ワクチン抗原のデザインを行い、*in vivo* 実験でその感染予防・重症化阻止効果を確認した。

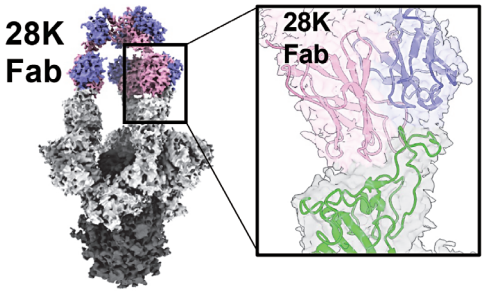


Fig.1 Structure of SARS-CoV-2 S protein bound to broadly neutralizing antibody UT-28K

2）SARS-CoV-2 の病原性研究

COVID-19 を引き起こす病原体である SARS-CoV-2 は、懸念される変異株 variants of concern（VOCs）に代表されるように変異を繰り返して、世界中で流行の波を形成してきた。その結果、ACE2 受容体により強く結合できるように進化して感染力が増した変異株や、パンデミック初期に感染やワクチン接種により獲得した液性免疫の多くが現在流行中の変異株に対して中和能を失う問題が生じた。そこで、2022 年においては、世界的流行の懸念がある新たな変異株による ACE2 受容体結合能と液性免疫逃避能の進化の構造基盤を構造解析により解明する研究を行った。2022 年夏から冬にかけて世界各地で流行が見られた BA.5 および BA.2.75 による中和抗体逃避と ACE2 受容体認識のバランス変化について理解するため、ACE2 受容体と S 蛋白質の複合体構造を決定した。BA.5 は F486V の変異を獲得しており、この変異箇所は上述したように変異株に対する広域中和抗体のコアエピトープになっているため、中和抗体逃避能に貢献していた。一方で、F486V により ACE2 受容体結合能は低下しており、この低下を補うため L452R の変異を獲得することで、親株である BA.2 と比べて ACE2 受容体結合能を維持していた。すなわち、BA.5 は抗体逃避能を高める方向に進化したことが考えられた。BA.2.75 は N460K の変異を獲得しており、構造解析の結果、この変異が ACE2 受容体の N90 結合型糖鎖との相互作用を強める役割を担っていることが示唆された（**Fig. 2**）。N460K は受容体結合能を高めるとともに表面電化を変えることで抗体逃避にも貢献しており、進化的に重要度の高い変異と考えられた。すなわち、BA.2.75 は受容体結合能を高める方向に進化したことが考えられた。

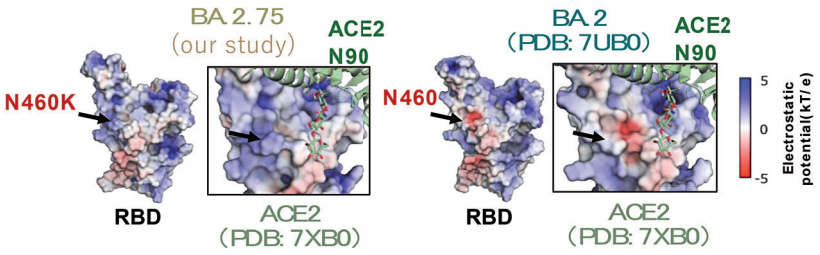


Fig.2 Electrostatic interaction of the N90-linked glycan of ACE2 with BA.2.75 RBD N460K compared to that of BA.2.

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 2022, the structural basis of the evolution in ACE2 receptor recognition and antibody evasion caused by SARS-CoV-2 variants was elucidated. Developments and mechanistic understandings were achieved for vaccine antigens, antiviral agents, and broad-spectrum neutralizing antibodies against SARS-CoV-2.

1）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 2022, structural analyses of the SARS-CoV-2 spike protein and broad-spectrum neutralizing antibodies were conducted to elucidate the mechanisms of action of these antibodies against SARS-CoV-2. Furthermore, vaccine antigen design was conducted, and the prophylactic and palliative effects against infection were confirmed by *in vivo* experiments.

2）Structural research against SARS-CoV-2 pathogenicity

SARS-CoV-2 has undergone multiple mutations leading to global waves of the pandemic, as evidenced by the emergence of Variants of Concern（VOCs）. Consequently, many VOCs have evolved to exhibit stronger binding to the ACE2 receptor, increasing their infectivity. Additionally, many of the humoral immune responses acquired through prior infection or vaccination during the early stages of the pandemic have lost their ability to neutralize the current epidemic variant. Therefore, in 2022, we investigated the structural changes underlying the evolution of ACE2 receptor binding and evasion from humoral immunity by newly emerged variants that pose global pandemic concerns. Our findings revealed that the F486X substitution enhances the escape of neutralizing antibodies at the expense of receptor binding capacity. Furthermore, we observed that the N460K substitution enhances the interaction with the N90-linked glycan of ACE2 receptor, but also contributes to antibody evasion.

List of Publication

Hasegawa, T., Imamura, R.M., Suzuki, T., Hashiguchi, T., Nomura, T., Otsuguro, S., Maenaka, K., Sasaki, M., Orba, Y., and Sawa, H.（2022）. Application of acoustic ejection MS system to high-throughput screening for SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin.** *70*, 199–201.

Hemmi, T., Ainai, A., Hashiguchi, T., Tobiume, M., Kanno, T., Iwata-Yoshikawa, N., Iida, S., Sato, Y., Miyamoto, S., and Ueno, A.（2022）. Intranasal vaccination induced cross-protective secretory IgA antibodies against SARS-CoV-2 variants with reducing the potential risk of lung eosinophilic immunopathology. **Vaccine.** *40*, 5892–5903.

Homma, T., Nagata, N., Hashimoto, M., Iwata-Yoshikawa, N., Seki, N.M., Shiwa-Sudo, N., Ainai, A., Dohi, K., Nikaido, E., and Mukai, A.（2022）. Immune response and protective efficacy of the SARS-CoV-2 recombinant spike protein vaccine S-268019-b in mice. **Scientific Reports.** *12*, 20861.

Kimura, I., Yamasoba, D., Tamura, T., Nao, N., Suzuki, T., Oda, Y., Mitoma, S., Ito, J., Nasser, H., and

Zahradnik, J.（2022）. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA. 2 subvariants, including BA. 4 and BA. 5. **Cell.** *185*, 3992–4007.

Ozawa, T., Tani, H., Anraku, Y., Kita, S., Igarashi, E., Saga, Y., Inasaki, N., Kawasuji, H., Yamada, H., and Sasaki, S.-I.（2022）. Novel super-neutralizing antibody UT28K is capable of protecting against infection from a wide variety of SARS-CoV-2 variants. **MAbs**（Taylor & Francis）, p. 2072455.

Saito, A., Tamura, T., Zahradnik, J., Deguchi, S., Tabata, K., Anraku, Y., Kimura, I., Ito, J., Yamasoba, D., and Nasser, H.（2022）. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA. 2.75 variant. **Cell host & microbe.** *30*, 1540–1555.

Shirogane, Y., Harada, H., Hirai, Y., Takemoto, R., Suzuki, T., Hashiguchi, T., and Yanagi, Y.（2023）. Collective fusion activity determines neurotropism of an en bloc transmitted enveloped virus. **Science Advances.** *9*, eadf3731.

Takemoto, R., Suzuki, T., Hashiguchi, T., Yanagi, Y., and Shirogane, Y.（2022）. Short-stalk isoforms of CADM1 and CADM2 trigger neuropathogenic measles virus-mediated membrane fusion by interacting with the viral hemagglutinin. **Journal of virology.** *96*, e01949-21.

List of Presentations

Hashiguchi T. Molecular mechanism of neutralization of a pan-SARS-CoV-2 antibody and ACE2-receptor recognition by BA.4/5 variants. **The 20th Awaji International Forum on Infection and Immunity**（**AIFII 20**）Awaji, Japan. Sep. 8. 2022.

Hashiguchi T. Glycan receptor and entry mechanism of mumps virus. **Sialoglyco2022**, Sep. 6. 2022

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**
准教授	**牧野　晶子**	**Assoc. Prof.**	**Akiko Makino**
助　教	**北畠　　真**	**Assist. Prof.**	**Makoto Kitabatake**
助　教	**神田　雄大**	**Assist. Prof.**	**Takehiro Kanda**
助　教	**松郷　宙倫**	**Assist. Prof.**	**Hiromichi Matsugo**
特定助教	**小森園　亮**	**Project Assist. Prof.**	**Ryo Komorizono**

本分野では、2022 年度は 4 月に大学院生命科学研究科修士課程 1 年として服部成喜が、10 月に博士後期課程 1 年として Meng-Chi Wu が進学してきた。また、4 月に神田雄大と松郷宙倫が助教として、小森園亮が特定助教として採用された。

以下に、2022 年 1 月から 2023 年 3 月までに本分野から報告された 3 つの研究成果について概要を記載する。

（1）コウモリゲノムにおける内在性ボルナウイルスの機能解明：大学院生命科学研究科博士課程を修了した向井八尋が、ユビナガコウモリ（miniopterid bats）のゲノムに内在化しているボルナウイルス由来ヌクレオプロテイン配列（miEBLN-1）の機能解析を行った。まず、in silico 解析を用いて、miEBLN-1 が RNA 結合タンパク質をコードしている可能性を予測するとともに、予測タンパク質の進化によりに自然選択（純化選択）が働いていることを示した。さらに、miEBLN-1 由来タンパク質（miEBLN-1p）がユビナガコウモリの様々な臓器で発現する RNA 結合タンパク質であることを明らかにした。さらに、miEBLN-1p が MOV10 や LINE-1 ORF1p のような細胞内の RNA 結合タンパクと RNA 依存的に相互作用することも示した。これらの結果は、miEBLN-1 は、その由来となったウイルスタンパク質と同様の RNA 結合因子としての機能を保持しつつも、新たな宿主タンパク質として進化してきたことを示していた。この結果は、内在化したウイルス遺伝子が宿主において外適応する際の機能的制約の解明に貢献するものである。

（2）「外因性に発現させたマトリックスタンパク質と糖タンパク質によるボルナ病ウイルス 1（BoDV-1）感染性粒子の形成促進」では、助教の神田が、プラスミドを用いて BoDV-1 のマトリックスタンパク質（M）と糖タンパク質（G）を一過性に発現させることで、感染性のある BoDV-1 粒子を高力価で回収できることを明らかにした。この知見をリバースジェネティクス法による組換え BoDV-1（rBoDV-1）の人工合成に応用することで、従来法の約 200 倍の感染性 rBoDV-1 を回収できる系を確立することに成功した（Fig. 1）。

この成果は、私たちが開発を進める BoDV-1 を用いたベクターシステムの研究を大幅に加速させるものである。また、適量の M は BoDV-1 の粒子形成を促進したのに対し、過剰量の M は細胞を

著しく障害することが確認され。これらの結果から、BoDV-1はMの発現量を制限し、粒子形成を抑制することで、細胞を傷害することなく持続感染している可能性が考察された。

（3）ボルナウイルスベクターを用いたSOD1変異ALSモデルラットの治療手段の開発：滋賀医科大学神経内科学教室の漆谷真教授ならびに南山素三雄博士との共同研究により、非常勤研究員である酒井まどかが、家族性筋萎縮性側索硬化症（ALS）の主要な原因である変異型SOD1に特異的な新規モノクローナル抗体（D3-1）の一本鎖可変フラグメント（scFv）を分泌する非伝播型ボルナウイルスベクター（RNA-based episomal vector: REVec）を開発し、オリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）に持続的に導入することに成功した。REVecによりD3-1一本鎖抗体を発現するOPC（OPC scFvD3-1）を、SOD1変異（H46R）をもつALSモデルラット単回髄腔内注射することで、モデルラットの発症を有意に遅延させ、寿命を延長させることが示された。OPCのscFvD3-1の効果は、全長D3-1抗体単独の1ヶ月間髄腔内注入の効果を上回った。また、OPC scFvD3-1は、神経細胞の減少とグリオーシスを抑制し、脊髄における変異型SOD1のレベルを低下させた。また、炎症性遺伝子の転写を抑制することも示された。本研究により、REVecと幹細胞を用いた新しい遺伝子細胞治療戦略の有効性が示された。

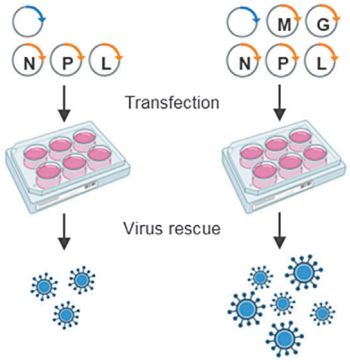


Fig. 1 High-titer rBoDV-1 can be rescued by reverse genetics using helper plasmids for M and G.

In the year 2022, Shigeki Hattori joined as a first-year Master's student in the Graduate School of Biostudies in April, and Meng-Chi Wu enrolled as a first-year doctoral student in the Doctoral Program in October. Additionally, in April, Drs. Takehiro Kanda and Masamichi Matsugo were appointed as assistant professors, and Dr. Ryo Komorizono was hired as a project-based assistant professor.

Below, we provide an overview of three research achievements reported by our laboratory from January 2022 to March 2023:

（1）Functional elucidation of endogenous bornavirus-like elements in bat genomes: Yahiro Mukai, who completed the Ph.D. program at the Graduate School of Biostudies, conducted a functional analysis of an endogenous bornavirus-like nucleoprotein 1（miEBLN-1）that is endogenized in the genome of the Miniopterid bats. Firstly, using in silico analysis, we predicted that miEBLN-1 potentially encodes an RNA-binding protein and demonstrated the presence of purifying selection acting on the evolution of the predicted protein. Furthermore, we revealed that the miEBLN-1-derived protein（miEBLN-1p）is an RNA-binding protein expressed in various organs of the Miniopterid bats. Additionally, it has been showed that miEBLN-1p interacts with several cellular RNA-binding proteins, such as MOV10 and LINE-1 ORF1p, in an RNA-dependent manner. These results indicated that while miEBLN-1 retains the functional characteristics of the viral protein it originated from as an RNA-binding factor, it has evolved as a novel host protein. These

findings contribute to the understanding of functional constraints during the adaptation of endogenized viral genes in hosts.

（2）In "Exogeneous expression of both matrix protein and glycoprotein facilitates infectious viral particle production of Borna disease virus 1", we demonstrated that high titer of infectious BoDV-1 particles could be rescued by the transient expression of both matrix protein（M）and glycoprotein（G）. By applying this finding, we succeeded in establishing a reverse genetics system that enables us to rescue a 200-fold higher titer of recombinant BoDV-1（rBoDV-1）than the conventional system. This result will accelerate the development of our BoDV-1 vector system. In addition, we also demonstrated that although an optimal expression of M facilitated the production of infectious BoDV-1, overexpression of M induced obvious cytotoxicity. These results indicated that BoDV-1 achieves non-cytotoxic persistent infection by restricting the expression level of M and reducing the infectious particle production.

（3）Development of therapeutic methods for SOD1-mutated ALS model rat using a bornavirus vector: Through collaborative research with Professor Makoto Urushitani and Dr. Sumio Minamiyama from the Division of Neurology Medicine at Shiga University of Medical Sciences, Dr. Madoka Sakai, a research staff, developed a non-propagating bornavirus vector（RNA-based episomal vector: REVec）that secretes a single-chain variable fragment（scFv）of a specific novel monoclonal antibody（D3-1）targeting the mutant form of SOD1, a major cause of familial amyotrophic lateral sclerosis（ALS）. We successfully introduced the OPC scFvD3-1, expressing the D3-1 scFv antibody, into oligodendrocyte precursor cells（OPCs）persistently using REVec. Intrathecal injection of OPC scFvD3-1 into the ALS model rats carrying the SOD1 mutation（H46R）significantly delayed the onset of the disease and extended their lifespan. The effect of OPC scFvD3-1 surpassed the effect of intrathecal injection of full-length D3-1 antibody alone for one month. Additionally, OPC scFvD3-1 suppressed neurodegeneration and gliosis and reduced the level of mutant SOD1 in the spinal cord. It was also shown to inhibit the transcription of inflammatory genes. This study demonstrated the effectiveness of a novel genetic cell therapy strategy using REVec and stem cells.

List of Publications

Mukai, Y., Horie, M., Kojima, S., Kawasaki, J., Maeda, K, Tomonaga, K.（2022）. An endogenous bornavirus-like nucleoprotein in miniopterid bats retains the RNA-binding properties of the original viral protein. FEBS Lett. 596（3）:323-337

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.

Matsunaga H, Takeuchi H, Oba Y, Fujimi S, Honda T, Tomonaga K. Waning of anti-SARS-CoV-2 spike antibody levels 100 to 200 days after the second dose of the BNT162b2 vaccine. **Vaccines** 10（2）:177.（2022）

Lin, HH., Horie, M., Tomonaga, K.（2022）. A comprehensive profiling of innate immune responses in

Eptesicus bat cells. **Microbiol Immunol.** 66（3）:97-112

Kanda, T., Sakai, M., Makino, A., Tomonaga, K.（2022）. Exogenous expression of both matrix protein and glycoprotein facilitates infectious viral particle production of Borna disease virus 1. **J Gen Virol**. 103（7）

Tarbouriech N, Chenavier F, Kawasaki J, Bachiri K, Bourhis JM, Legrand P, Freslon L, Roy A, Laurent EMN, Suberbielle E, Ruigrok RWH, Tomonaga K, Gonzalez-Dunia D, Horie M, Coyaud E, Crépin T.（2022）. Borna disease virus 1 phosphoprotein forms a tetramer and in-teracts with host factors involved in DNA double-strand break repair and mRNA processing. **Viruses** 14（11）:2358

Kanda T, Tomonaga K.（2022）. Reverse genetics and artificial replication systems of Borna disease virus 1. **Viruses**. 14（10）:2236.

Matsugo, H., Kamiki, H., Ishida, H., Kobayashi-Kitamura, T., Takenaka-Uema, A., Murakami, S., Horimoto, T.（2023）. Direct evidence of fiber-protein-directed hemagglutination by canine adenoviruses. **Arch Virol.** 168（3）:93

Kawasaki J, Tomonaga K, Horie M.（2023）Large-scale investigation of zoonotic viruses in the era of high-throughput sequencing. **Microbiol Immunol.** 67（1）:1-13.

Matsunaga H, Fukumori A, Mori K, Morihara T, Sato S, Kitauchi K, Yanagida K, Taguchi K, Honda T, Tomonaga K.（2023）. Ribavirin treatment of severe schizophrenia with positive anti-Borna disease virus antibodies 30 years after onset: a case report. **Case Rep Psychiatry**. 2023: 4899364.

Yamazaki H, Yamamoto N, Sonoyama T, Nasu S, Maruoka H, Makino A, Tomonaga K, N Shigemoto, Ohge H, Fujiwara K, Shinohara S, Takeno S, Omori K, Naito Y.（2023）A Multicenter study to investigate the positive rate of SARS-CoV-2 in middle ear and mastoid specimens from otologic surgery patients. **Auris Nasus Larynx** 50（2）:285-291.

Minamiyama S, Sakai M, Yamaguchi Y, Kusui M, Wada W, Hikiami R, Yoshitaka T, Asada M, Shodai A, Makino A, Fujiwara N, Ayaki T, Maki T, Warita H, Aoki M, Tomonaga K, Takahashi R, Urushitani M.（2023）. Efficacy of oligodendrocyte precursor cells as delivery vehicles for single-chain variable fragment to misfolded SOD1 in ALS rat model. **Mol Ther Methods Clin Dev**. 28, 312-329,

北畠真（共著）（2023）. mRNA の制御機構の解明と治療薬・ワクチンへの活用　技術情報協会 ISBN：978-4-86104-937-8

List of Presentations

Tomonaga, K. Bornavirus Research: Exploring the Neovirology. The University of Toledo, Department of Medical Microbiology & Immunology Seminar, Web, April 20, 2022.

Tomonaga, K. Research Progress of orthobornaviruses in Kyoto University. 国立臺灣大学獣医学研究院セ

ミナー , Taipei City, December 12, 2022.

Kanda, T. Reverse Genetics System of Orthobornaviruses and Its Applications. 国立臺灣大学獣医学研究院セミナー , December 12, 2022.

Makino, A., Fujino, K., Tomonaga, K. Pathogenicity of variegated squirrel bornavirus. International Union of Microbiological Societies, Web, July 20-22, 2022.

Sakai, M., Yusa, K., Tomonaga, K., Makino, A. Crispr/Cas9 screening for host factors involved in SARS-CoV-2 infection. International Union of Microbiological Societies, Web, July 20-22, 2022.

小森園亮 . マイナーなウイルスで病気を治す . 12th Entrepreneur Candidate Club（ECC-iCAP）、Web、2022 年 1 月 28 日

朝長啓造 . 鳥ボルナウイルス感染症と研究の現状 . オンラインセミナー「鳥ボルナウイルス感染症」を知る、Web、2022 年 5 月 29 日

Kanda, T., Horie, M., Tomonaga, K. Unsteady elongation at 3’ terminal of genomic RNA determines replication efficiency of Borna disease virus 1. 第 23 回日本 RNA 学会年会、京都、2022 年 7 月 20 -22 日

Komorizono, R., Tanaka, C., Yoshizumi, S., Tomonaga, K. Development of an RNA virus-based episomal vector with artificial aptazyme for switching gene expression off. 第 23 回日本 RNA 学会年会、京都、2022 年 7 月 20 -22 日

芳野素一、相原尚之、志賀崇徳、曽我玲子、牧野晶子、朝長啓造、上家潤一．トリボルナウイルス自然感染鳥における皮膚病変とウイルス局在の解析．第 165 回日本獣医学会学術集会、Web、2022 年 9 月 6-8 日

松郷宙倫、北村知也、関根渉、大平浩輔、上間亜希子、堀本泰介、村上晋　日本のコウモリ由来 MERS 関連コロナウイルスのリバースジェネティクス系の確立　第 165 回日本獣医学会学術集会、Web、2022 年 9 月 6-8 日

Kaneko, M., Komorizono, R., Makino, A., Tomonaga, K. Intranuclear viral RdRp of Borna disease virus 1 interferes with host RNA maturation and metabolism. 第 20 回あわじ感染と免疫国際フォーラム、Web、2022 年 9 月 7-9 日

Kanda, T., Santos, P., Hoper, D., Beer, M., Rubbenstroth, D., Tomonaga, K. Establishment of a reverse genetics system for Borna disease virus 2. 第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13-15 日

Bea Garcia, Yahiro Mukai, Keizo Tomonaga, Masayuki Horie Ancient bornaviral X and P genes are endogenously expressed as a chimeric mRNA with ZNF451 gene in miniopterid bat cells. 第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13-15 日

松郷宙倫、北村知也、関根渉、大平浩輔、上間亜希子、堀本泰介、村上晋　日本のコウモリ由来

MERS 関連コロナウイルスのリバースジェネティクス系の確立と性状解析　第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13-15 日

Komorizono, R., Kawanaka, M., Yoshizumi, S., Tomonaga, K. Product of a human endogenous bornavirus-like element suppresses RNA interference in mammalian cells. 第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13-15 日

Sakai, M., Yusa, K., Tomonaga, K., Makino, A. Involvement of TRIM28/33 in SARS-CoV-2 replication. 第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13-15 日

Kaneko, M., Sakai, M., Okuno, Y., Inuki, S., Tomonaga, K., Makino, A. Identification of a small compound that inhibits Borna disease virus 1 in vitro. 第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13-15 日

川崎純菜 . ウイルス考古学 : 生物ゲノムからウイルスの分子化石を発掘する . 第 45 回分子生物学会年会、千葉、2022 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

Bea Garcia, Yahiro Mukai, Keizo Tomonaga, Masayuki Horie The hidden diversity of ancient bornaviral sequences from X and P genes in vertebrate genomes 第 45 回分子生物学会年会、千葉、2022 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

川崎純菜、小嶋将平、朝長啓造、堀江真行　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 . 2022 年日本バイオインフォマティクス学会年会・第 11 回生命医薬情報学連合大会、大阪、2022 年 9 月 13-15 日

小森園亮 . 新規ウイルスベクターを用いた遺伝子治療薬の開発　BRAVE GATE Meetup（Beyond Next Ventures）、東京、2023 年 2 月 18 日

村田梢、牧野晶子、朝長啓造、升本英利 . ヒト iPS 細胞由来マイクロ心臓組織を用いた SARS-CoV-2 持続感染系の確立 . 第 22 回日本再生医療学会、京都、2023 年 3 月 23-25 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**
准教授	**杉田　征彦**	**Assoc. Prof.**	**Yukihiko Sugita**
助　教	**中野　雅博**	**Assist. Prof.**	**Masahiro Nakano**
助　教	**村本裕紀子**	**Assist. Prof.**	**Yukiko Muramoto**

本分野では、一般的なウイルス学的手法に加えて電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いた手法により、微細構造学的観点からインフルエンザウイルス、エボラウイルス、ラッサウイルスなどの細胞内増殖機構を解明することを目指している。また、ウイルスの細胞内増殖機構を分子レベルで理解することにより、ウイルス増殖を阻害する抗ウイルス薬開発や、ウイルス感染をブロックする抗体医薬の開発にも取り組んでいる。2022 年度は、インフルエンザウイルス核タンパク質の核小体移行がリボヌクレオタンパク質複合体の形成に必須であることを解明した。また、マールブルグウイルス核タンパク質 -RNA 複合体の立体構造を解析し、核タンパク質 -RNA 複合体の形成に重要な相互作用を明らかにした。

1）インフルエンザウイルス核タンパク質の核小体移行はリボヌクレオタンパク質複合体形成に必須である

A 型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（RNP）は、二重らせん構造を形成しており、ゲノム RNA の転写および複製を担っている。RNP の形成はウイルス感染細胞の核内で行われるが、核内のどのドメインがこのプロセスに関わっているのかは不明であった。そこで今年度は、RNP 形成における核小体の重要性について検討した。ウイルス核タンパク質（NP）は、RNP の主要な構成因子であるが、ウイルス感染細胞の核小体に一時的に局在する。NP の核小体移行シグナル（NoLS）に変異を導入したところ、二重らせん構造を持つ RNP が形成されなくなり、結果的にウイルス RNA 合成能を消失した。一方でこの変異 NP に NoLS を異所的に融合させた変異 NP は、二重らせん構造を持つ機能的な RNP を形成することができた。さらに、ウイルス感染細胞の核小体を薬剤処理により破壊したところ、NP は二重らせん RNP を形成できなくなり、ウイルス RNA 合成能も低下した。これらの結果は、NP の核小体への移行は機能的な RNP を形成するためには必須のステップであり、インフルエンザウイルスの生活環における核小体の重要性を示している。

2）マールブルグウイルス核タンパク質 –RNA 複合体の立体構造解析

エボラウイルス（EBOV）の近縁種であるマールブルグウイルス（MARV）の核タンパク質（NP）

は、一本鎖マイナス鎖のウイルスゲノム RNA と結合し、らせん状の NP–RNA 複合体を形成する。このらせん状 NP–RNA 複合体は、ウイルスの RNA 合成を担うヌクレオキャプシドの中心構造である。ヌクレオキャプシドが形成される際、NP と RNA の適切な相互作用が必要であるが、その形成機構は未解明であった。そこで本研究では、NP–RNA 複合体の立体構造を高分解能で決定し、NP–RNA 複合体の形成に重要な相互作用を明らかにすることで、ヌクレオキャプシド形成機構を解明することを目的とした。クライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子解析を行った結果、MARV の NP–RNA 複合体の立体構造を 3.1 Åの分解能で決定した。この立体構造は EBOV の NP–RNA 複合体の構造と非常に類似しており、両ウイルスのヌクレオキャプシド形成には共通した機構が存在することが示唆された。次に、MARV NP の変異体を作製し、らせん状 NP–RNA 複合体形成とウイルス RNA 合成に重要なアミノ酸残基を同定した。興味深いことに、EBOV の NP においても、相当するアミノ酸残基がらせん状 NP–RNA 複合体形成やウイルス RNA 合成に必須であることを明らかにした。以上の結果は、MARV および EBOV のヌクレオキャプシド形成機構の理解に資するものであり、抗フィロウイルス薬開発へと進展することが期待される。

Virus infections are accompanied by numerous morphological changes in viral and cellular components. Our laboratory aims to elucidate the replication mechanism of influenza, Ebola, and Lassa viruses from the ultrastructural point of view, by using different microscopic analytical methods such as electron microscopy and high-speed atomic force microscopy. In 2022, we showed that migration of influenza virus nucleoprotein into the nucleolus is essential for ribonucleoprotein complex formation. Furthermore, we determined the structure of the Marburg virus nucleoprotein–RNA complex using cryo-electron microscopy and identified key residues for helical assembly and subsequent viral RNA synthesis.

1）Migration of influenza virus nucleoprotein into the nucleolus is essential for ribonucleoprotein complex formation

Influenza A virus double-helical ribonucleoprotein complex（RNP）performs transcription and replication of viral genomic RNA（vRNA）. Although RNP formation occurs in the nuclei of virus-infected cells, the nuclear domains involved in this process remain unclear. Here, we show that the nucleolus is an essential site for functional RNP formation. Viral nucleoprotein（NP）, a major RNP component, temporarily localized to the nucleoli of virus-infected cells. Mutations in a nucleolar localization signal（NoLS）on NP abolished double-helical RNP formation, resulting in a loss of viral RNA synthesis ability, whereas ectopic fusion of the NoLS enabled the NP mutant to form functional double-helical RNPs. Furthermore, nucleolar disruption of virus-infected cells inhibited NP assembly into double-helical RNPs, resulting in decreased viral RNA synthesis. Collectively, our findings demonstrate that NP migration into the nucleolus is a critical step for functional RNP formation, showing the importance of the nucleolus in the influenza virus life cycle.

2）Structural insight into Marburg virus nucleoprotein–RNA complex formation.

The nucleoprotein（NP）of Marburg virus（MARV）, a close relative of Ebola virus（EBOV）, encapsidates the single-stranded, negative-sense viral genomic RNA（vRNA）to form the helical NP–RNA complex. The NP–RNA complex constitutes the core structure for the assembly of the nucleocapsid that is responsible for viral RNA synthesis. Although appropriate interactions among NPs and RNA are required for the formation of nucleocapsid, the structural basis of the helical assembly remains largely elusive. Here, we show the structure of the MARV NP–RNA complex determined using cryo-electron microscopy at a resolution of 3.1 Å. The structures of the asymmetric unit, a complex of an NP and six RNA nucleotides, was very similar to that of EBOV, suggesting that both viruses share common mechanisms for the nucleocapsid formation. Structure-based mutational analysis of both MARV and EBOV NPs identified key residues for helical assembly and subsequent viral RNA synthesis. Importantly, most of the residues identified were conserved in both viruses. These findings provide a structural basis for understanding the nucleocapsid formation and contribute to the development of novel antivirals against MARV and EBOV.

List of Publications

Miyamoto, S., Nakano, M., Morikawa, T., Hirabayashi, A., Tamura, R., Fujita-Fujiharu, Y., Hirose, N., Muramoto, Y., and Noda, T.（2022）Migration of influenza virus nucleoprotein into the nucleolus is essential for ribonucleoprotein complex formation. **mBio** *13*, e03315-21.

Miyamoto, S., Muramoto, Y., Shindo, K., Fujita-Fujiharu, Y., Morikawa, T., Tamura, R., Gilmore, J.L., Nakano, M., and Noda, T.（2022）Contribution of RNA–RNA interactions mediated by the genome packaging signals for the selective genome packaging of influenza A virus. **J. Virol.** *96*, e0164121.

Zhang, Z., Nomura, N., Muramoto, Y., Uemura, T., Liu, K., Yui, M., Kono, N., Aoki, J., Noda, T., Iwata, S., Ohto, U., and Shimizu, T.（2022）Structure of SARS-CoV-2 membrane protein essential for virus assembly. **Nat. Commun.** *13*, 4399.

Sano, E., Suzuki, T., Itoh, Y., Sakamoto, A., Sakai, Y., Saito, A., Okuzaki, D., Motooka, D., Muramoto, Y., Noda, T., Takasaki, T., Sakuragi, J., Minami, S., Kobayashi, T., Yamamoto, T., Okamoto, T., and Takayama, K.（2022）Cell response analysis in SARS-CoV-2 infected bronchial organoids. **Commun. Biol.** *5*, 516.

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. **Sci. Signal.** *15*, eabm5011.

Asami, J., Terakado-Kimura, K., Fujita-Fujiharu, Y., Ishida, H., Nomura, Y., Liu, K., Uemura, T., Sato, Y., Ono, M., Yamamoto, M., Noda, T., Drew, D., Shigematsu, H., Iwata, S., Shimizu, T., Nomura, N., and

Ohto, U.（2022）Structure of the human hepatitis B virus entry receptor NTCP. **Nature** *606*, 1021-1026.

Fujita-Fujiharu, Y., Sugita, Y., Takamatsu, Y., Houri, K., Igarashi, M., Muramoto, Y., Nakano, M., Tsunoda, Y., Taniguchi, I., Becker, S., and Noda, T.（2022）Structural insight into Marburg virus nucleoprotein-RNA complex formation. **Nat. Commun.** *13*, 1191.

Shinoda, H., Iida, T., Makino, A., Yoshimura, M., Ishikawa, J., Ando, J., Murai, K., Sugiyama, K., Muramoto, Y., Nakano, M., Kiga, K., Cui, L., Nureki, O., Takeuchi, H., Noda, T., Nishimasu, H., and Watanabe, R.（2022）Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis. **Commun. Biol.** *5*, 473.

Takamatsu, Y., Yoshikawa, T., Kurosu, T., Fukushi, S., Nagata, N., Shimojima, M., Ebihara, H., Saijo, M., and Noda, T.（2022）Role of VP30 Phosphorylation in Ebola Virus Nucleocapsid Assembly and Transport. **J. Virol.** *96*, e0108322.

Hashimoto, R., Takahashi, J., Shirakura, K., Funatsu, R., Kosugi, K., Deguchi, S., Yamamoto, M., Tsunoda, Y., Morita, M., Muraoka, K., Tanaka, M., Kanbara, T., Tanaka, S., Tamiya, S., Tokunoh, N., Kawai, A., Ikawa, M., Ono, C., Tachibana, K., Kondoh, M., Obana, M., Matsuura, Y., Ohsumi, A., Noda, T., Yamamoto, T., Yoshioka, Y., Torisawa, Y.S., Date, H., Fujio, Y., Nagao, M., Takayama, K., and Okada, Y.（2022）SARS-CoV-2 disrupts respiratory vascular barriers by suppressing Claudin-5 expression. **Sci. Adv.** *8*, eabo6783.

Cui, G., Shimba, A., Jin, J., Ogawa, T., Muramoto, Y., Miyachi, H., Abe, S., Asahi, T., Tani-Ichi, S., Dijkstra, J.M., Iwamoto, Y., Kryukov, K., Zhu, Y., Takami, D., Hara, T., Kitano, S., Xu, Y., Morita, H., Zhang, M., Zreka, L., Miyata, K., Kanaya, T., Okumura, S., Ito, T., Hatano, E., Takahashi, Y., Watarai, H., Oike, Y., Imanishi, T., Ohno, H., Ohteki, T., Minato, N., Kubo, M., Holländer, G.A., Ueno, H., Noda, T., Shiroguchi, K., and Ikuta, K.（2022）A circulating subset of iNKT cells mediates antitumor and antiviral immunity. **Sci. Immunol.** *7*, eabj8760.

Hu, S., and Noda, T.（2022）Filovirus helical nucleocapsid structures. **Microscopy**（**Oxf**）dfac049.

Suno, R. †*, Sugita, Y. †, Morimoto, K. †, Takazaki, H., Tsujimoto, H., Hirose, M., Suno-Ikeda, C., Nomura, N., Hino, T., Inoue, A., Iwasaki, K., Kato, T., Iwata, S., and Kobayashi, T.（2022）Structural insights into the G protein selectivity revealed by the human EP3-Gi signaling complex. **Cell Rep.** *40*, 111323.

Iida, T., Ando, J., Shinoda, H., Makino, A., Yoshimura, M., Murai, K., Mori, M., Takeuchi, H., Noda, T., Nishimasu, H., and Watanabe, R.（2023）Compact wide-field femtoliter-chamber imaging system for high-speed and accurate digital bioanalysis. **Lab Chip.** *234*, 684-691.

Deguchi, S., Kosugi, K., Hashimoto, R., Sakamoto, A., Yamamoto, M., Krol, R.P., Gee, P., Negoro, R., Noda, T., Yamamoto, T., Torisawa, Y.S., Nagao, M., and Takayama, K.（2023）Elucidation of the liver pathophysiology of COVID-19 patients using liver-on-a-chips. **PNAS Nexus.** *2*, pgad029.

List of presentations

Yukihiko Sugita. Structural analysis on pathogenic viruses. FY2021 Cryo-Electron Microscopy Course at OIST, Okinawa, 1 March, 2022（招待講演）

野田岳志　フィロウイルスのヌクレオカプシド形成機構　日本顕微鏡学会 第 78 回学術講演会、福島、2022 年 5 月 13 日（招待講演）

藤田陽子、杉田征彦、野田岳志　螺旋分子複合体の単粒子解析:フィロウイルス核タンパク質 -RNA 複合体の構造解析を例に　第 22 回日本蛋白質科学会、筑波、2022 年 6 月 9 日（招待講演）

藤田陽子　Structural Analysis of Emerging Viruses by Cryo-Electron Microscopy　2022 年度顕微鏡学会若手シンポジウム、京都、2022 年 10 月 12 日（招待講演）

藤田陽子　フィロウイルスの単粒子解析　生理研研究会「新世代のクライオ電子顕微鏡」、愛知、2022 年 11 月 1 日（招待講演）

杉田征彦　マイナス鎖 RNA ウイルスの核タンパク質－ RNA 複合体構造　日本顕微鏡学会第 65 回シンポジウム、岡山、2022 年 11 月 5 日（招待講演）

杉田征彦　ウイルスの構造　新興再興感染症制御学特別講義（岐阜大学・鳥取大学共同獣医学科）、岐阜、2022 年 12 月 16 日（招待講演）

Yoko Fujita. Strategies to Solve Macromolecular Structures: Towards Understanding Filovirus Assembly. FY2022 Cryo-Electron Microscopy Course at OIST, Okinawa, 9 February, 2023（招待講演）

Yukihiko Sugita. Structural studies of pathogenic RNA viruses using electron microscopy. 東北大学大学院生命科学研究科・イノベーションセミナー , Miyagi, 13 March, 2023（招待講演）

村本裕紀子、鈴木和也、中野雅博、平林愛、大串雅俊、羽田早織、谷山暢子、大西知帆、永樂元次、野田岳志　ヒト鼻腔オルガノイドを用いた新型コロナウイルスの増殖機構の解析　第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13 日

Shangfan Hu, Junichi Kajikawa, Shuzo Urata, Jiro Yasuda, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda　Potential role of tight junction protein Claudin-1 in LCMV cell-to-cell transmission　第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 14 日

Shangfan Hu, Yoko Fujita-Fujiharu, Yukihiko Sugita,, Lisa Wendt, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, Thomas Hoenen, Takeshi Noda　Cryo-EM structure of the nucleoprotein-RNA complex of a novel filovirus, Lloviu virus　第 60 回日本生物物理学会、函館、2022 年 9 月 29 日

Yukiko Muramoto, Kazuya Suzuki, Masahiro Nakano, Ai Hirabayashi, Masatoshi Ohgushi, Saori Hada, Nobuko Taniyama, Chiho Onishi, Mototsugu Eiraku, Takeshi Noda. Studies on SARS-CoV-2 replication in human nasal organoids. OPTIONS XI for the Control of INFLUENZA, Belfast, UK, 29 September, 2022

Yoko Fujita-Fujiharu, Yukihiko Sugita, Yuki Takamatsu, Kazuya Houri, Manabu Igarashi, Yukiko Muramoto,

Masahiro Nakano, Yugo Tsunoda, Ichiro Taniguch, Stephan Becker, Takeshi Noda. Structural basis of Marburg virus helical nucleoprotein-RNA complex formation. 17th International Symposium of The Institute Network, Kanazawa, 14 October, 2022

Shangfan Hu, Yoko Fujita-Fujiharu, Yukihiko Sugita, Lisa Wendt, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, Thomas Hoenen, Takeshi Noda. Cryo-EM structure of the nucleoprotein-RNA complex of a novel filovirus, Lloviu virus. The 4th East-Asia Microscopy Conference, Taiwan, 5 December, 2022

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】

酒井グループはヒトパピローマウイルス（HPV: Human Papillomavirus）の研究を行っている。研究にあたっては理学研究科の大学院生が1名、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、その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、ウイルスのコードする制御遺伝子産物の役割を探ると共に、企業との共同研究として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（一般にイボと呼ばれる）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）. The infection of HPV is involved in tumorigenesis and malignant progression of stratified epithelium.

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 HCV 複製機構の解析は、主として、自然界には存在しない､培養細胞への適応変異が導入された HCV1b ゲノムを用いて行われてきたが､我々は､患者由来の野生型ゲノムを有する HCV1b 培養細胞系を新たに構築してきた。本年はこの野生型 HCV1b の全長ゲノムを培養細胞に導入し、これを立体培養することで、感染性のウイルス粒子を産生させる実験系を構築した。

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。この 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 を用いた発現の抑制を行い、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 have established the genome replication system for wild type（WT）hepatitis C virus genotype 1b

（HCV1b）although the present models for HCV genome replication have been made up for HCV genome that possesses adaptive mutation（AM）to cultured cells. In this year, we developed the model production system of WT HCV1b. The cells established from Huh7.5 cells constitutively producing SEC14L2 were transfected with whole genomic RNA of WT HCV1b, KT9 strain, and cultured in the three-dimensional condition. The replication of the WT HCV1b genome was confirmed in the cells, as well as production of infectious HCV particles in the culture medium.

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 Presentation

Akahori Y., Katsuki S., Aly H.H., Hijikata M.: Molecular mechanism of HBV RNA degradation induced by bardoxolone methyl. 2022 International HBV Meeting, Paris, France, Sept. 18-22.

SONG HOJOONG, 宮山陽平、茶山一彰 , 茶山弘美 , 今村道雄 , 寺岡雄史 , 渡士幸一、土方誠 : 野生型 HCV1b の組換え体感染性粒子産生系の構築　第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13 日～ 15 日

赤堀祐一 , 香月沙葉 , アリ・フセイン ハッサン , 土方誠 : Bardoxolone methylにより誘導される抗HBV宿主制限因子の探索と機能解明　第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13 日～ 15 日

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

細胞制御分野
Laboratory of Cell Regulation

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

研究室の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細胞傷害性 T 細胞応答を発見し、その成立基盤の全容解明を進めている。本年度、研究対象をアカゲザルからヒトへと展開し、リポペプチドを結合するヒト MHC クラス 1 アリルの同定と構造決定に成功した。また、T 細胞受容体によるリポペプチド認識の分子機構の解析を通して、non-epitopic residues affecting ligand plasticity and antigenicity（NR-PA）の概念を構築した。他方、マクロファージの集合体である結核肉芽腫の中心部には S100A9 陽性好中球が集積するという発見を起点とした好中球／マクロファージ相互作用の研究は、好中球による S100A9/Cox2 経路を介したマクロファージ極性化制御機構の解明へと結実した。この機構は結核の慢性病態だけでなく、がん微小環境の構築にも深く関与することが実証されつつある。

1）リポペプチド免疫の成立基盤

リポペプチドを結合するヒト MHC クラス 1 分子の同定と構造決定

アカゲザルにおいて、N ミリストイル化ウイルスタンパク質の N 末端リポペプチド断片を標的とした細胞傷害性 T 細胞応答が存在する（J Immunol, 2011; J Virol, 2013）。さらに、リポペプチド抗原を結合し、細胞傷害性 T 細胞へと提示する新しい MHC クラス 1 サブセットの存在が明らかとなっている（Nat Commun, 2016; J Immunol, 2019; J Biol Chem, 2020）。しかしながら、ヒトを含めた他の哺乳類におけるリポペプチド特異的 T 細胞応答の存在や機序は未検証である。本年度、アカゲザルリポペプチド提示 MHC クラス 1 分子群の構造学的な洞察をもとに、リポペプチドを結合するヒト MHC クラス 1 アリル（HLA-A*2402, HLA-C*1402）を同定した。アカゲザルリポペプチド提示 MHC クラス 1 分子群がリポペプチドのみを結合しペプチドを結合しないのとは対照的に、HLA-A*2402 や HLA-C*1402 は物性の異なるペプチドとリポペプチドをともに結合することができる。その分子基盤を明らかにするために、それぞれを結合した HLA クラス 1 複合体の X 線結晶構造を解明したところ、リガンドの種類に応じて抗原結合ポケットの水素結合ネットワークが可塑的に再構築され、ポケット構造のリモデリングが起きることがわかった（J Biol Chem, 2022）。このことは、アミノ酸変異を伴うことなく抗原リガンドレパトアを拡大する新たな機構として注目される。その免疫学的意義を個体レベルで検証するため、HLA-A*2402 トランスジェニックマウスの樹立ならびにペプチド輸送体（TAP）欠損マウスとの交配を完了した。

T 細胞受容体（TCR）によるリポペプチド認識の分子機構の解明

N- ミリストイル化 SIV Nef リポペプチド（Myr-Gly-Gly-Ala-Ile）を結合したサル MHC クラス 1 分子と特異的 TCR との X 線共結晶構造から、ミリストイル化グリシン残基のアミド基がリポペプチド抗原の唯一の T 細胞エピトープとして機能することが明らかとなっている（Int Immunol, 2020）。他方、ペプチド部分は直接的な T 細胞エピトープとはならないが、一部のアミノ酸残基はリポペプチドのコンフォメーションを制御することにより T 細胞エピトープの空間的配置を決定づけることがわかった。過去の結晶構造の網羅的解析から、従来のペプチドリガンドにおいても T 細胞エピトープとはならないがリガンドの可塑性や抗原性を制御するアミノ酸残基の存在が見出されたことから、これらの残基を non-epitopic residues affecting ligand plasticity and antigenicity（NR-PA）と命名した（Int Immunol, 2023）。とりわけ可塑性の高いアシル鎖と短いペプチド鎖で構成されるリポペプチド抗原においては、NR-PA が自己・非自己識別の重要な要素となっている可能性が高い。

2）慢性炎症における好中球／マクロファージ相互作用

当研究室で確立したモルモット結核モデルの解析から、肺肉芽腫深部には好中球が集積し、それが産生する S100A9 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を報告した（Blood Adv, 2016）。さらに、S100A9 欠損（A9KO）マウスを樹立し、ウシ結核菌ワクチン株（BCG）によるマウス感染モデルの解析を行うことで、好中球が S100A9 依存的に抗炎症性 M2 マクロファージを誘導することが明らかとなっている。今年度、一連の分子生物学解析を通して、好中球 S100A9 がプロスタグランジン合成酵素である Cox2 の発現を誘導すること、また Cox2 に対する特異的阻害剤（セレコキシブ）を投与したモルモット結核モデルにおいて、肉芽腫深部における M2 マクロファージの誘導が阻害されることを実証し、S100A9/Cox2 経路に依存した新たなマクロファージ極性化制御機構を提唱した（iScience, 2023）。肉芽腫 M2 マクロファージは結核菌感染のリザーバーとして持続感染の温床になることから、今回新たに明らかとなった好中球における S100A9/Cox2 経路は、結核の慢性化や潜在化の病態形成に深く関与すると考えられる。また、結核肉芽腫とがんの炎症環境には共通項が多いことから、好中球 S100A9 シグナルががん微小環境におけるマクロファージ極性制御に作動する可能性を想起し、担がんマウスモデルの検証を行った。興味深いことに、A9KO マウスの乳がん細胞接種後の生存率は野生型マウスに比べて高くなることを観察した。S100A9 によるマクロファージ極性化の制御が、とりわけがん細胞の遠隔転移の局面において重要な役割を果たす可能性の検証とその分子機構の解明に向けた研究を展開している。

1）Basic principles of lipopeptide immunity

Lipopeptide-binding molecules in humans

Cytotoxic T-lymphocyte responses to N-myristoylated viral protein-derived lipopeptides exist in rhesus monkeys（J Immunol, 2011; J Virol, 2013）, which are mediated by a novel subset of MHC class I molecules（Nat Commun, 2016; J Immunol, 2019; J Biol Chem, 2020）. It remains to be addressed, however, whether

such lipopeptide immunity may exist in other mammals, including humans. By taking advantage of critical insights obtained from structures of rhesus lipopeptide-presenting MHC class I molecules, we have now identified HLA-A*2402 and HLA-C*1402 as human allomorphs with the capacity of binding lipopeptide ligands. These human MHC class I molecules bind both conventional peptides and lipopeptides, which contrasts sharply with rhesus lipopeptide-presenting molecules that apparently lack the ability to bind peptides. X-ray crystallographic analyses of HLA-A*2402 and HLA-C*1402 complexed with peptide and lipopeptide ligands detected remodeling of antigen-binding pockets upon ligand binding（J Biol Chem, 2022）, suggesting a novel mechanism of ligand repertoire expansion. HLA-A*2402 transgenic mice and those deficient in TAP functions have been established to assess how its dual binding ability may impact on host immunity.

Lipopeptide recognition by T-cell receptors（TCRs）

Cocrystal structures of SIV Nef lipopeptide（Myr-Gly-Gly-Ala-Ile）-bound rhesus MHC class I molecules complexed with specific TCRs have been elucidated to identify the amide group of the N-myristoylated glycine residue as a primary T-cell epitope（Int Immunol, 2020）. The peptide chain does not apparently offer direct T-cell epitopes; yet, a couple of amino acid residues affect antigenicity. We argue that these residues critically control plasticity of lipopeptide ligands and serve to determine the spatial position of the T-cell epitope upon TCR docking; therefore, we propose to refer to these residues as non-epitopic residues affecting ligand plasticity and antigenicity（NR-PA）（Int Immunol, 2023）.

2）Neutrophil/macrophage interactions in chronic inflammation

By utilizing our guinea pig tuberculosis model, we have recently shown that S100A9, expressed dominantly in neutrophils, is critical for the formation of granulomas, an organized globular collection of activated macrophages and other immune cells（Blood Adv. 2016）. These granulomas contain a unique niche at the core, composed primarily of S100A9-expressing neutrophils and M2 macrophages. A series of molecular biological analyses as well as those with S100A9 knockout（A9KO）mice revealed that nuclear S100A9 functions as a co-transcription factor that activates the Cox-2 gene promoter in BCG-sensitized neutrophils. This resulted in upregulated expression of prostaglandin E2, which potentiates macrophages to differentiate into M2-type cells. Consistent with this, induction of M2 macrophages at the core of granulomas was impaired in the guinea pig tuberculosis model that was treated with the Cox2 inhibitor Celecoxib. On the basis of these findings, we propose a key role of the neutrophil S100A9/Cox2 axis in creating a local niche that supports prolonged survival of microbes in chronic tuberculosis pathology（iScience, 2023）. Similar to tuberculosis granulomas, cancer microenvironments also contain M2 macrophages that are closely associated with tumor-infiltrating neutrophils, and their role in supporting cancer development has been suggested. We have recently observed that A9KO mice survive significantly longer than control mice after inoculation of mammary tumor cells, and the impact of the neutrophil S100A9/Cox2 axis in cancer development will be determined explicitly in our laboratory.

List of Publications

Asa, M., Morita, D., Kuroha, J., Mizutani, T., Mori, N., Mikami, B., Sugita, M.（2022）. Crystal structures of N-myristoylated lipopeptide-bound HLA class I complexes indicate reorganization of B-pocket architecture upon ligand binding. **J. Biol. Chem.** *298*, 102100

Urata S, Omotuyi OI, Izumisawa A, Ishikawa T, Mizuta S, Sakurai Y, Mizutani T, Ueda H, Tanaka Y, Yasuda J.（2022）. Identification of novel chemical compounds targeting filovirus VP40-mediated particle production. **Antiviral Res.** 199, 105267.

Morita, D., Asa, M., Sugita, M.（2023）. Engagement with the TCR induces plasticity in antigenic ligands bound to MHC class I and CD1 molecules. **Int. Immunol.** *35*, 7-17.

Mizutani T, Ano T, Yoshioka Y, Mizuta S, Takemoto K, Ouchi Y, Morita D, Kitano S, Miyachi H, Tsuruyama T, Fujiwara N, Sugita M. Neutrophil S100A9 supports M2 macrophage niche formation in granulomas.（2023）. **iScience.** 26（3）: 106081.

List of Presentations

Morita, D., and Sugita, M. A molecular basis for specific recognition of lipopeptides by TCRs. The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kumamoto, December 7-9, 2022.

Asa, M., Morita, D., and Sugita, M. Dynamic B-pocket remodeling is a basis for HLA class I molecules to bind peptides and lipopeptides. The 51th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Kumamoto, December 7-9, 2022.

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、免疫系細胞の機能分化と免疫応答の制御機構を解明することを通じ、生体恒常性の維持・破綻・修復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免疫機能の賦活化と免疫疾患の増悪、性ホルモンによる免疫機能と免疫疾患の性差の機序、IL-7 と IL-15 産生細胞によるリンパ球の機能分化ならびに組織における免疫応答の作動原理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）循環型 iNKT 細胞サブセットは抗腫瘍免疫と抗ウイルス免疫を仲介する

インバリアントナチュラルキラー T（iNKT）細胞は自然免疫と獲得免疫の両方の役割を併せ持つ組織常在性自然免疫様 T リンパ球であり、全身と局所の免疫応答に不可欠である。本研究では iNKT 細胞の不均一性に注目し、NK 受容体 CD244（2B4）とケモカイン受容体 CXCR6 を用い、胸腺内成熟 iNKT 細胞を $CD244^-CXCR6^-$（C0）iNKT 細胞、$CD244^-CXCR6^+$（C1）iNKT 細胞および $CD244^+CXCR6^+$（C2）iNKT 細胞に分画した。胸腺上皮細胞特異的 IL-15 欠損マウスを用いて、胸腺髄質上皮細胞由来の IL-15 が C0 iNKT 細胞から C2 iNKT 細胞への分化に重要であることを示した。さらに、デジタル RNA-seq 法を用いた網羅的な遺伝子発現解析により、C2 iNKT 細胞は IFN-γ やグランザイムなどの細胞傷害活性物質を強く発現し NK 細胞に近い特徴を示すのに対し、C1 iNKT 細胞は ICOS や CD5 などの T 細胞受容体シグナル関連分子を強く発現し T 細胞に近い性質を示すことを見出した。また、パラビオーシス実験により、末梢の C2 iNKT 細胞は従来の組織常在型 C1 iNKT 細胞と異なり、全身循環型の細胞であることを見出した。メラノーマ細胞による肺移転モデルやインフルエンザウイルス感染モデルを用いて、C2 iNKT 細胞は抗腫瘍免疫と抗ウイルス免疫を亢進させることを明らかにした。さらに、ヒト末梢血中においてもマウスと同様に細胞傷害活性の高い $CD244^+CXCR6^+$ C2 iNKT 細胞が存在することを示した。以上の結果から、従来の組織常在型 C1 iNKT 細胞と異なり、胸腺の IL-15 に強く依存して分化する循環型 C2 iNKT 細胞が存在し、抗腫瘍免疫と抗ウイルス免疫に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

2）アンドロゲンは Th2 細胞のサイトカイン産生を抑制することでアレルギー性気道炎症を緩和する

自己免疫疾患やアレルギーなどの免疫疾患は、男性よりも女性の患者が多いことが知られてい

る。その原因の一つに性ホルモンの関与が示唆されるが、性ホルモンとアレルギーとの関係については不明であった。T 細胞だけでアンドロゲン受容体遺伝子を欠損するマウスにアレルギー性気道炎症を誘導して、アンドロゲンが T 細胞の機能と気道炎症に与える影響を解析したところ、アンドロゲンが Th2 細胞においてアレルギーを増悪させる IL-5 などの 2 型サイトカインの産生を抑制することが明らかとなった。さらに、この抑制機構が、アンドロゲン受容体が Dusp2 遺伝子に結合してその発現を上昇させ、p38 の脱リン酸化を促進することで引き起こされることが示された。以上の結果から、アンドロゲンが 2 型ヘルパー T（Th2）細胞の DUSP2-p38 経路を介してサイトカイン産生を抑制することで、アレルギー性気道炎症を抑えることが明らかになった。この結果は成人後に男性の喘息の頻度が低下することを良く説明している。本研究で得られた知見は、効果の高い喘息の治療薬の開発や他の免疫疾患における性差の機序の解明など、さらなる研究に発展することが期待される。

The goal of our laboratory is to unravel the principles of maintenance, perturbation, and repair of organismal homeostasis by elucidating the regulatory mechanisms of immune responses by immune cells. Specifically, we are studying the function of the interleukin-7 receptor in the immune system, the immunoenhancing effects of glucocorticoids, the sex bias in immunity and autoimmunity regulated by sex hormones, and the role of stromal cells producing IL-7 or IL-15 in tissue immune responses. The results of this year's research are described below.

1）A circulating subset of iNKT cells mediates antitumor and antiviral immunity

Invariant natural killer T（iNKT）cells are a group of innate-like T lymphocytes characterized by their multifaceted roles bridging innate and adaptive immune responses. They are believed to be resident within tissues and play a pivotal role in systemic and local immune regulation. To investigate the heterogeneity of iNKT cells, we characterized iNKT cells in the thymus and peripheral tissues. In the thymus, iNKT cells were classified into three distinct subpopulations based on the expression of the natural killer cell receptor CD244 and the chemokine receptor CXCR6. These subpopulations were designated as C0（$CD244^-CXCR6^-$）, C1（$CD244^-CXCR6^+$）, or C2（$CD244^+CXCR6^+$）iNKT cells. The development and maturation of C2 iNKT cells from C0 iNKT cells was strictly dependent on IL-15 produced by thymic epithelial cells. Notably, C2 iNKT cells expressed high levels of IFN-γ and granzymes, exhibiting more NK cell-like characteristics, whereas C1 iNKT cells showed more T cell-like characteristics. Furthermore, C2 iNKT cells were influenced by the microbiome and aging and suppressed the expression of the autoimmune regulator AIRE in the thymus. In peripheral tissues, C2 iNKT cells circulated and were distinct from conventional tissue-resident C1 iNKT cells. Functionally, C2 iNKT cells protected against the tumor metastasis of melanoma cells by enhancing anti-tumor immunity in mice and promoted antiviral immune responses against influenza virus infection. Furthermore, we identified a corresponding subset in humans, characterized by the expression of CD244 and CXCR6, which shared high cytotoxic properties akin to mouse C2 iNKT cells. In summary, this

study reveals a circulating subset of iNKT cells with NK cell-like properties that are distinct from conventional tissue-resident iNKT cells. These findings provide novel insights into the layered structure of iNKT cells with distinct development, dynamics, and functions.

2）Androgens alleviate allergic airway inflammation by suppressing cytokine production in Th2 cells

Asthma exhibits a higher prevalence in females compared to males following adolescence. Nevertheless, the underlying mechanism behind the sex disparity in asthma remains elusive. To investigate the potential role of sex steroid hormones in T cells during asthma development, we examined airway inflammation in mice with T cell-specific deficiencies in the androgen receptor（AR）and estrogen receptors（ERs）. Male mice lacking the AR, specifically in T cells, displayed more severe allergic airway inflammation induced by house dust mite exposure than control male mice. In contrast, female mice with T cell-specific deficiencies in ERα and ERβ exhibited a similar degree of inflammation as control female mice. Moreover, administration of dihydrotestosterone reduced cytokine production by Th2 cells derived from control naive T cells but not from AR-deficient naive T cells. Transfer of AR-deficient Th2 cells from OT-II transgenic mice into wild-type mice resulted in more pronounced allergic airway inflammation induced by ovalbumin than control Th2 cells. Gene expression profiling unveiled an upregulation of genes associated with cell cycle and Th2 differentiation in AR-deficient Th2 cells. Conversely, the expression of dual specificity phosphatase（DUSP）-2, a negative regulator of p38, was downregulated. Notably, a chromatin immunoprecipitation assay suggested that the AR binds to an AR motif in the 5' untranslated region of the *Dusp2* gene in Th2 cells. Furthermore, a reporter assay revealed that the *Dusp2* promoter containing a wild-type AR motif, but not a mutated motif, was transactivated by dihydrotestosterone. Lastly, using a retroviral vector, ectopic expression of DUSP-2 reduced IL-4 expression in Th2 cells. Thus, these findings indicate that androgen signaling suppresses cytokine production by Th2 cells through the induction of DUSP-2, which may partly explain the sex bias observed in asthma prevalence after adolescence.

List of Publications

Jin, J., Yamamoto, R., Takeuchi, T., Cui, G., Miyauchi, E., Hojo, N., Ikuta, K., Ohno, H., and Shiroguchi, K.（2022）. High-throughput identification and quantification of single bacterial cells in the microbiota. **Nat. Commun.**, 13: 863.

Kansler, E. R., Dadi, S., Krishna, C., Nixon, B. G., Stamatiades, E. G., Liu, M., Kuo, F., Zhang, J., Zhang, X., Capistrano, K., Blum, K. A., Weiss, K., Kedl, R. M., Cui, G., Ikuta, K., Chan, T. A., Leslie, C. S., Hakimi, A. A. and Li, M. O.（2022）. Cytotoxic innate lymphoid cells sense cancer cell-expressed interleukin-15 to suppress human and murine malignancies. **Nat. Immunol.**, 23: 904-915.

Adachi, A., Honda, T., Egawa, G., Kanameishi, S., Takimoto, R., Miyake, T., Hossain, M. R., Komine, M., Ohtsuki, M., Gunzer, M., Ikuta, K., and Kabashima, K.（2022）. Estradiol suppresses psoriatic

inflammation in mice by regulating neutrophil and macrophage functions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 150: 909-919.e8.

Das Gupta, D., Paul, C., Samel, N., Bieringer, M., Staudenraus, D., Marini, F., Raifer, H., Menke, L., Hansal, L., Camara, B., Roth, E., Daum, P., Wanzel, M., Mernberger, M., Nist, A., Bauer, U-M., Helmprobst, F., Buchholz, M., Roth, K., Bastian, L., Hartmann, A. M., Baldus, C., Ikuta, K., Neubauer, A., Burchert, A., Jäck, H-M., Klein, M., Bopp, T., Stiewe, T., Pagenstecher, A., and Lohoff, M.（2022）. IRF4 deficiency vulnerates B-cell progeny for leukemogenesis via somatically acquired Jak3 mutations conferring IL-7 hypersensitivity. **Cell Death Differ.**, 29: 2163-2176.

Ejima, A., Abe, S., Shimba, A., Sato, S., Uehata, T., Tani-ichi, S., Munakata, S., Cui, G., Takeuchi, O., Hirai, T., Kato, S., and Ikuta, K.（2022）. Androgens alleviate allergic airway inflammation by suppressing cytokine production in Th2 cells. **J. Immunol.**, 209: 1083-1094.

Ikuta, K., Ejima, A., Abe, S., and Shimba, A.（2022）. Control of immunity and allergy by steroid hormones. **Allergol. Int.**, 71: 432-436.

Rodríguez-Caparrós, A., Tani-ichi, S., Casal, Á., López-Ros, J., Suñé, C., Ikuta, K., and Hernández-Munain, C.（2022）. Interleukin-7 receptor signaling is crucial for enhancer-dependent TCRδ germline transcription mediated through STAT5 recruitment. **Front. Immunol.**, 13: 943510.

Cui, G., Shimba, A., Jin, J., Ogawa, T., Muramoto, Y., Miyachi, H., Abe, S., Asahi, T., Tani-ichi, S., Dijkstra, J. M., Iwamoto, Y., Kryukov, K., Zhu, Y., Takami, D., Hara, T., Kitano, S., Xu, Y., Morita, H., Zhang, M., Zreka, L., Miyata, K., Kanaya, T., Okumura, S., Ito, T., Hatano, E., Takahashi, Y., Watarai, H., Oike, Y., Imanishi, T., Ohno, H., Ohteki, T., Minato, N., Kubo, M., Holländer, G. A., Ueno, H., Noda, T., Shiroguchi, K., and Ikuta, K.（2022）. A circulating subset of iNKT cells mediates antitumor and antiviral immunity. **Sci. Immunol.**, 7: eabj8760.

Akter, S., Shimba, A., Ikuta, K., Al Mahmud, R., Yamada, S., Sasanuma, H., Tsuda, M., Sone, M., Ago, Y., Murai, K., Tanaka, H., and Takeda, S.（2023）. Physiological concentrations of glucocorticoids induce pathological DNA double-strand breaks. **Genes Cells**, 28: 53-67.

Asahi, T., Abe, S., Tajika, Y., Rodewald, H. R., Sexl, V., Takeshima, H., and Ikuta, K.（2023）. Retinoic acid receptor activity is required for the maintenance of type 1 innate lymphoid cells. **Int. Immunol.**, 35: 147-155.

谷一靖江、生田宏一（2022）. $\gamma\delta$ T 細胞の恒常性維持機構　**炎症と免疫** *30*, 212-214.

生田宏一（2022）. 免疫系の概日リズム はじめに　**医学のあゆみ** *281*, 157.

榛葉旭恒、生田宏一（2022）. グルココルチコイドによる免疫応答能の概日制御　**医学のあゆみ** *281*, 159-163.

崔広為、生田宏一（2023）. 循環型 iNKT 細胞サブセットが抗腫瘍免疫と抗ウイルス免疫を仲介する

サイエンス・イムノロジー誌に載った日本人研究者　**Science Immunology *2023 issue***, 6-7.

List of Presentations

崔広為、生田宏一 新規末梢循環型 iNKT 細胞の同定と機能解析　Kyoto T Cell Conference 第 31 回学術集会、オンライン、2022 年 5 月 28 日

高見大地、阿部真也、榛葉旭恒、旭拓真、崔広為、谷一靖江、原崇裕、生田宏一 Lung local IL-7 affect the maintenance, distribution, and activation of ILC2 in allergic airway inflammations　第 51 回日本免疫学会学術集会、熊本、2022 年 12 月 8 日

旭拓真、生田宏一　Hepatic ILC1s lacking IL-7 receptor arise independently of conventional group 1 ILCs through parenchymal niches　第 51 回日本免疫学会学術集会、熊本、2022 年 12 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

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および細胞内タンパク質輸送機構の研究を行っている。コラーゲンは脊椎動物において大量に産生される細胞外マトリックスタンパク質で、骨格形成や臓器の形態形成に重要な働きをしている。コラーゲンは小胞体で生合成された 3 本の α 鎖がより合わさって長径約 300-400 nm の棒状の分子を形成する。このように大きな棒状の分子が、どのようにして小胞体からゴルジ装置へと輸送されるのかについては多くの研究が行われてきたが、様々な仮説が提唱されており今なお活発に議論されている。私たちはこの問題を解明するため、蛍光タンパク質 GFP を付加したコラーゲン分子を作製し、細胞に発現させてその動きを live-cell imaging 法を用いて解析した。代表的な線維形成性コラーゲンである III 型コラーゲンおよび比較的短いトリプルヘリクス領域を持つ X 型コラーゲンについて解析を行った。その結果、どちらのコラーゲンも、直径約 300-400 nm の小胞によって小胞体からゴルジ装置へと輸送されることが明らかになった（Fig. 1A）。またこれらのコラーゲンは、一般的な積み荷タンパク質と同じ小胞に梱包されて輸送されることも明らかになった（Fig. 1B）。さらにノックダウン法を用いて生化学的解析を行い、輸送に必要な因子を調べて IV 型コラーゲンでの結果とも比較検討した結果、III 型、IV 型および X 型コラーゲンの輸送には、それぞれ異なった因子が必要とされると考えられた。また、III 型コラーゲンは、小胞体からゴルジ装置へと輸送される前に、小胞体内腔で液 - 液相分離様の濃縮構造を形成することが明らかになった（Fig. 1A）。本構造の形成がコラーゲンの細胞内輸送を促進するメカニズムの解明は興味深い課題である。

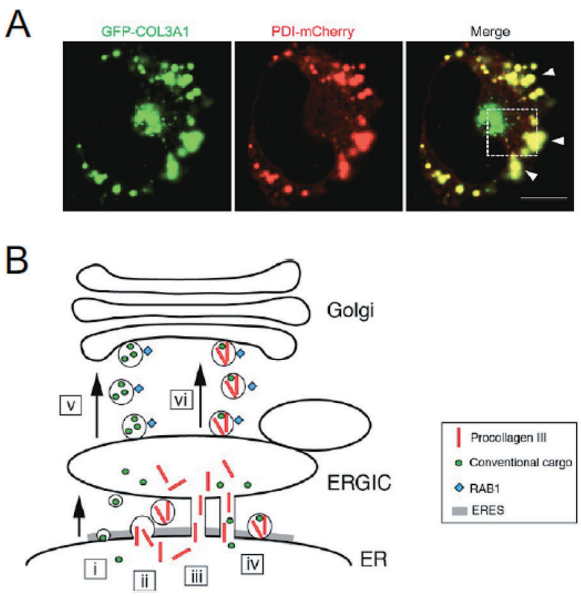


Fig. 1. ER-to-Golgi transport of GFP-procollagen III.
A. Live-cell imaging.
B. Scheme of procollagen III transport.

1）Protein quality control mechanism and intracellular transport of proteins（Hosokawa G）

In the living organisms, newly synthesized proteins obtain their native conformations by the assistance of chaperone proteins and folding enzymes by a mechanism known as a protein quality control. Secretory and membrane proteins are synthesized in the ER（endoplasmic reticulum）, and only correctly folded proteins are further sorted into the secretory pathway. Collagens are the major extracellular matrix proteins in vertebrates, and create the frameworks of tissues, organs, and the bodies. Three α-chains of procollagens synthesized in the ER form a triple helix and sorted to the secretory pathway. The procollagen molecule has a rod-like structure of ~300-400 nm in length. To elucidate how such large molecules are transported within the cells, we have constructed procollagens tagged with GFP and analyzed the intracellular trafficking by performing live-cell imaging. Type III collagen is a typical fibril-forming collagen and type X collagen has a relatively short triple-helical collagenous region. We have elucidated that both procollagens were transported from the ER to the Golgi apparatus by vesicles with a diameter of ~300-400 nm（Fig. 1A）. These transport vesicles also delivered conventional cargo at the same time（Fig. 1B）. We further analyzed proteins required for the ER-to-Golgi transport of procollagens III and X using siRNA mediated knock-down, and fond that factors necessary for the transport of procollagens are different depending on the types of procollagens. We also found that type III procollagen formed droplet-like structures similar to liquid-liquid phase separation in the ER. The mechanism how such structures accelerate procollagen transport requires further analysis.

List of Publications

Hirata Y, Matsui Y, Wada I, Hosokawa N.: ER-to-Golgi trafficking of procollagen III via conventional vesicular and tubular carriers. Mol. Biol. Cell, 33（3）:ar21（2022）. doi: 10.1091/mbc.E21-07-0372

Hosokawa N.: Isolation and binding assay of ER-degradation enhancing α-mannosidase-like proteins（EDEMs）. “Glycoscience Protocols（GlycoPODv2）”（Eds S. Nishihara, J. Hirabayashi, KF. Aoki-Kinoshita, K. Angata *et. al.*）NCBI Bookshelf（in press）

Hosokawa N.: Protein degradation assay for endoplasmic reticulum-associated protein degradation（ERAD）in mammalian cells. “Glycoscience Protocols（GlycoPODv2）”（Eds S. Nishihara, J. Hirabayashi, KF. Aoki-Kinoshita, K. Angata *et. al.*）NCBI Bookshelf（in press）

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

Masri S, Zawani M, Zulkiflee I, Salleh A, Fadilah NIM, Maarof M, Wen APY, Duman F, Tabata Y, Aziz IA, Bt Hj Idrus R, Fauzi MB.（2022）Cellular Interaction of Human Skin Cells towards Natural Bioink via 3D-Bioprinting Technologies for Chronic Wound:A Comprehensive Review. Int J Mol Sci. 2022 Jan 1;23（1）:476. doi: 10.3390/ijms23010476.

Nur Izzah Md Fadilah, Isma Liza Mohd Isa, Wan Safwani Wan Kamarul Zaman, Yasuhiko Tabata and Mh Busra Fauzi.（2022）The Effect of Nanoparticle-Incorporated Natural-Based Biomaterials towards Cells on Activated Pathways: A Systematic Review. *Polymers* 2022, *14*（3）, 476; https://doi.org/10.3390/polym14030476

Nii T, Tabata Y.（2021）Immunosuppressive mesenchymal stem cells aggregates incorporating hydrogel microspheres promote an in vitro invasion of cancer cells. Regenerative Therapy 18（2021）516-522

Yasutomo Miura, Mase Sato, Toshie Kuwahara, Tomoki Ebata Yasuhiko Tabata, Hidetoshi Sakurai.（2022）

DTransplantation of human iPSC-derived muscle stem cells in the diaphragm of Duchenne muscular dystrophy model mice. PLOS ONE https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266391

Sho Takehana, Wenxuan Yang, and Yasuhiko Tabata.（2022）Potential Method of Autophagy Imaging with Cationized Gelatin Nanospheres Incorporating Molecular Beacon. *ACS Appl. Bio Mater.* https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00287

Yoichi Saito, Yukio Fujiwara, Yusuke Shinchi, Remi Mito, Yuji Miura, Tomoya Yamaguchi, Koei Ikeda, Shinji Urakami, Yuta Nakashima, Takuro Sakagami, Makoto Suzuki, Yasuhiko Tabata, Yoshihiro Komohara.（2022）Classification of PD-L1 expression in various cancers and macrophages based on immunohistocytological analysis. Cancer Science. 113:3255–3266

Yusuke Uemoto, Kojiro Taura, Daichi Nakamura, Li Xuefeng, Nguyen Hai Nam, Yusuke Kimura, Kenji Yoshino, Hiroaki Fuji, Tomoaki Yoh, Takahiro Nishio, Gen Yamamoto, Yukinori Koyama, Satoru Seo, Tatsuaki Tsuruyama, Keiko Iwaisako, Shinji Uemoto, Yasuhiko Tabata, and Etsuro Hatano.（2022）Bile Duct Regeneration with an Artificial Bile Duct Made of Gelatin Hydrogel Nonwoven Fabrics. TISSUE ENGINEERING: Part A, 28（17-18）:737-748

Tomo Unzai, Taichi Washisaka, Yasuhiko Tabata.（2022）An Artificial Silk Elastin-Like Protein Modifies the Polarization of Macrophages.ACS Appl Bio Mater, doi: 10.1021/acsabm.2c00701

Takahisa Suzuki, Shigeru Tsunoda, Kota Yamashita, Toshie Kuwahara, Mitsuru Ando, Yasuhiko Tabata and Kazutaka Obama.（2022）A Simple Preparation Method of Gelatin Hydrogels Incorporating Cisplatin for Sustained Release. Pharmaceutics14, 2601. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122601

Karin Yoshizaki, Hidetaka Nishida, Yasuhiko Tabata, Jun-ichiro Jo, Ikuhiko Nakase, Hideo Akiyoshi.（2022）Controlled release of canine MSC-derived extracellular vesicles by cationized gelatin hydrogels. Regenerative Therapy, 22, 1-6

V. Ravi, A. Murashima-Suginami, H. Kiso, Y. Tokita, C.L. Huang, K. Bessho, J. Takagi, M. Sugai, Y. Tabata, K. Takahashi.（2023）Advances in tooth agenesis and tooth regeneration. Regenerative Therapy 22（2023）160e168

Yuki Murata, Jun-ichiro Jo, and Yasuhiko Tabata.（2023）Molecular Beacon Imaging System to Discriminate the Differentiation State of Cells from Energy Metabolic Pathways. American Chemical Society Publications. https://doi.org/10.1021/acssensors.3c00106

田畑泰彦（2023）核酸・ペプチド医薬品に求められるDDS技術． CHEMISTRY&CHEMICAL INDUSTRY vol.76-2

Yt Jun Cheah, Mohd Heikal Mohd Yunus, Mh Busra Fauzi, Yasuhiko Tabata, Yosuke Hiraoka, Shou Jin Phang, Min Rui Chia, Muhamad Ramdzan Buyong & Muhammad Dain Yazid.（2023）Gelatin–chitosan–cellulose nanocrystals as an acellular scaffold for wound healing application: fabrication, characterisation and cytocompatibility towards primary human skin cells. Cellulose 30, 5071–5092

（2023）. https://doi.org/10.1007/s10570-023-05212-w

Yuanjiaozi Li, Michiharu Sakamoto, Kumiko Matsuno, Eiichi Sawaragi, Qiannan Zhao, Takashi Nakano, Hiroki Yamanaka, Itaru Tsuge, Yasuhiro Katayama, Naoki Shimada, Yuuka Watahiki, Yasuhiko Tabata, Naoki Morimoto.（2023）Modified gelatin hydrogel nonwoven fabrics（Genocel）as a skin substitute in murine skin defects. Regen Ther. 2023 Apr 4;23:44-51. doi: 10.1016/j.reth.2023.03.003. PMID: 37090030; PMCID: PMC10119678.

Yoichi Saito, Yukio Fujiwara, Yuji Miyamoto, Koji Ohnishi, Yuta Nakashima, Yasuhiko Tabata, Hideo Baba, Yoshihiro Komohara.（2022）CD169^{+} sinus macrophages in regional lymph nodes do not predict mismatch-repair status of patients with colorectal cancer. Cancer Med. 2023 May;12（9）:10199-10211. doi: 10.1002/cam4.5747. Epub 2023 Feb 27. PMID: 36846928; PMCID: PMC10225197.

Ahmad Mus'ab Ahmad Hariza, Mohd Heikal Mohd Yunus, Mh Busra Fauzi, Jaya Kumar Murthy, Yasuhiko Tabata, Yosuke Hiraoka.（2023）The Fabrication of Gelatin-Elastin-Nanocellulose Composite Bioscaffold as a Potential Acellular Skin Substitute. Polymers（Basel）. 2023 Feb 3;15（3）:779. doi: 10.3390/polym15030779. PMID: 36772084; PMCID: PMC9920652.

Nurkhuzaiah Kamaruzaman, Mh Busra Fauzi, Yasuhiko Tabata and Salma Mohamad Yusop.（2023）Functionalised Hybrid Collagen-Elastin for Acellular Cutaneous Substitute Applications. *Polymers* 2023, *15*（8）, 1929; https://doi.org/10.3390/polym15081929

Kimura T, Yamada H, Teraoka M, Joko T, Iwata S, Tabata Y, Wakisaka H, Hato N.（2021）Intratympanic Insulin-like Growth Factor-1 Administration Via the Otic Bulla in a Severe Facial Paralysis Model. Otol Neurotol. 2021 Oct 1;42（9）:e1376-e1381. doi: 10.1097/MAO.0000000000003263. PMID: 34224549.

Xin-Chi Jiang, Hong-Hui Wu, Tianyuan Zhang, Yun-Fei Dong, Yao-Sheng Li, Ting Huang, An-Hao Tian, Peng-Xiang Chen, Xian-Ming Lin, Ying-Zhi Huang, Chong Liu, Xiang-Nan Zhang, Zhong Chen, Yasuhiko Tabata & Jian-Qing Gao.（2022）Biological nano agent produced by hypoxic preconditioning stem cell for stroke treatment. Nano Res. 16, 7413–7421（2023）. https://doi.org/10.1007/s12274-023-5470-z

Mazlan Zawani, Manira Maarof, Yasuhiko Tabata, Antonella Motta and Mh Busra Fauzi.（2022）Quercetin-Embedded Gelastin Injectable Hydrogel as Provisional Biotemplate for Future Cutaneous Application: Optimization and In Vitro Evaluation. Gels 2022, 8（10）, 623; https://doi.org/10.3390/gels8100623

Yasushi Konegawa, Toshie Kuwahara, Jun-Ichiro Jo, Kozue Murata, Takahide Takeda, Tadashi Ikeda, Kenji Minatoya, Hidetoshi Masumoto, Yasuhiko Tabata.（2022）Pioglitazone-incorporated microspheres targeting macrophage polarization alleviates cardiac dysfunction after myocardial infarction. Eur J Cardiothorac Surg. 2022 Oct 4;62（5）:ezac414. doi: 10.1093/ejcts/ezac414. PMID: 35946548.

Nicolas Touya, Ayako Washio, Chiaki Kitamura, Adrien Naveau, Yasuhiko Tabata, Raphaël Devillard and Olivia Kérourédan.（2022）In Vivo Application of Silica-Derived Inks for Bone Tissue Engineering: A

10-Year Systematic Review. *Bioengineering* 2022, *9*, 388. https://doi.org/10.3390/bioengineering 9080388

Yuko Kinoshita, Yoshimasa Takafuji, Katsumi Okumoto, Yuto Takada, Hiroki Ehara, Yuya Mizukami, Naoyuki Kawao, Jun-Ichiro Jo, Yasuhiko Tabata, Hiroshi Kaji.（2022）Irisin improves delayed bone repair in diabetic female mice. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24（3）:1809. https:// doi.org/10.3390/ijms24031809

Yoshimasa Takafuji, Naoyuki Kawao, Takashi Ohira, Yuya Mizukami, Kiyotaka Okada, Jun-Ichiro Jo, Yasuhiko Tabata, Hiroshi Kaji.（2022）Extracellular vesicles secreted from mouse muscle cells improve delayed bone repair in diabetic mice. 2023 Volume 70 Issue 2 Pages 161-171

Nusaibah Sallehuddin, Nur Izzah Md Fadilah, Ng Min Hwei, Adzim Poh Yuen Wen, Salma Mohamad Yusop, Nor Fadilah Rajab, Yosuke Hiraoka, Yasuhiko Tabata, Mh Busra Fauzi.（2022）Characterization and Cytocompatibility of Collagen–Gelatin–Elastin（CollaGee）Acellular Skin Substitute towards Human Dermal Fibroblasts: In Vitro Assessment.Biomedicines 2022, 10（6）, 1327; https://doi.org/10.3390/ biomedicines10061327

Syafira Masri, Manira Maarof, Nor Fatimah Mohd, Yosuke Hiraoka, Yasuhiko Tabata, Mh Busra Fauzi.（2022）Injectable Crosslinked Genipin Hybrid Gelatin–PVA Hydrogels for Future Use as Bioinks in Expediting Cutaneous Healing Capacity: Physicochemical Characterisation and Cytotoxicity Evaluation. Biomedicines 2022, 10（10）, 2651; https://doi.org/10.3390/biomedicines10102651

Yao-Sheng Li, Hong-Hui Wu, Xin-Chi Jiang, Tian-Yuan Zhang, Yi Zhou, Ling-Ling Huang, Pei Zhi, Yasuhiko Tabata, Jian-Qing Gao.（2022）Active stealth and self-positioning biomimetic vehicles achieved effective antitumor therapy. J Control Release. 2021 Jul 10;335:515-526

Ting Huang, Tianyuan Zhang, Xinchi Jiang, Ai Li, Yuanqin Su, Qiong Bian, Honghui Wu, Ruyi Lin, Ni Li, Hongcui Cao, Daishun Ling, Jinqiang Wang, Yasuhiko Tabata, Zhen Gu, Jianqing Gao.（2022）Iron oxide nanoparticles augment the intercellular mitochondrial transfer-mediated therapy. Sci Adv. 2021 Oct;7 （40）: eabj0534

Unzai, T., Washisaka, T., Tabata, Y.（2022）. An artificial silk elastin-like protein modifies the polarization of macrophages. ACS Appl. Bio Mater. 5, 5657-5664.

Wenxuan, Y., Jun-ichiro, J., and Yasuhiko, T., A reverse transfection system with cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon as a tool to visualize cell function.（2023）ACS Appl. Bio Mater.

Suzuki, T., Tsunoda, S., Yamashita, K., Kuwahara, T., Ando, M., Tabata, Y and Obama, K.（2022）. A Simple Preparation Method of Gelatin Hydrogels Incorporating Cisplatin for Sustained Release. Pharmaceutics, 14, 2601

Washisaka, T., Tabata, Y. Live Imaging of Monocyte/Macrophage Differentiation with Cationized Gelatin

Nanospheres Incorporating a Molecular Beacon. ACS Biomater. Sci. Eng. *9*（*5*）, 2672-2682

Li, Y., Sawaragi, E., Sakamoto, M., Nakano, T., Yamanaka, H., Tsuge, I., Matsuno, K., Tabata, Y., and Morimoto, N.（2022）. Development of gelatin hydrogel nonwoven fabrics（Genocel®）as a novel skin substitute in murine skin defects. Regen. Ther. 21, 96–103.

Li, Y., Sakamoto, M., Matsuno, K., Sawaragi, E., Zhao, Q., Nakano, T., Yamanaka, H., Tsuge., I., Katayama, Y., Shimada, N., Watahiki, Y., Tabata, Y. and Morimoto, N.（2023）. Modified gelatin hydrogel nonwoven fabrics（Genocel）as a skin substitute in murine skin defects. Regen. Ther. 23, 44–51.

List of Presentations

海外での招待講演

Tabata, Y. Biomaterials Technology to Promote in vivo Cell Recruitment for Regenerative Therapy. SFB/JSB Joint Symposium, Hawaii, USA. January.8-10（online 併催）

Tabata, Y.Regenerative Biomaterials of Drug Delivery Systems for Advanced Medical Therapy and Research.Venice, Italy.September.20-23

Tabata, Y.Essence of Biomaterial Technology for Realization of Regenerative Medicine. ICPSCM-2022 International conference on Polymer Science and Composite Materials, April.14-15（Virtual）

Yasuhiko Tabata. Big role of biomaterials technology in regenerative medicine and stem cell research.2022 KIPS International Symposium Monash University-Kyoto University Joint Symposium on Polymer Science, Online, October 28, 2022

Yasuhiko Tabata. Elucidating and modulating macrophage and stem cell responses to bioactive nanoclays for bone regeneration.【AMED】Networking Event within the Program for Technological Innovation of Regenerative Medicine, Online, July 21, 2022

Yasuhiko Tabata. Biomaterials technology to realize regenerative medicine of an advanced medical strategy. VEBLEO. Online, June 24, 2022　④

Yasuhiko Tabata. Significance of Dual Drug Release in Tissue Regeneration Therapy. TERMIS-EU 2022. Krakow, Poland. June 28-July 1, 2022　⑤

Yu-Min Chen, Yasuhiko Tabata, Incorporation of gelatin microspheres and fibers in cell aggregates to enhance cellular functions, The 22th Japanese Society for Regenerative Medicine, Kyoto, March 23-25, 2023

Wenxuan, Y., Satoshi, A., and Yasuhiko, T., Design of cationized gelatin nanospheres as a carrier for mitochondria transplantation to rescue cell functions. 2022 TERMIS-AP Virtual Student Paper Contest, online, December 17, 2022.

Washisaka, T., Tabata, Y. Preparation of Cationized Gelatin Nanospheres Incorporating Molecular Beacon to

Visualize Monocytes Differentiation into Macrophages. 2022 TERMIS-AP, online, December 17, 2022.

国内でのシンポジウム招待講演

田畑泰彦　再生医療関連についての業界動向と就職の心構え等．大阪バイオメディカル専門学校特別講義、大阪、2022 年 1 月 17 日

田畑泰彦　バイオマテリアルからみた再生医療の現状・課題・今後．積水化学工業株式会社（開発研究所）講演、大阪、2022 年 4 月 12 日

田畑泰彦　高分子バイオマテリアルの細胞バイオテクノロジー・先端医療への新展開 . 高分子学会茨城地区活動講演会、オンライン、2022 年 6 月 15 日

田畑泰彦　再生医療の定義とヒト胎盤抽出物への期待．株式会社日本生物製剤　講演、福岡、2022 年 7 月 14 日

田畑泰彦　材料技術の重要性がますます高まっている再生医療～ 細胞能力を高めるバイオテクノロジー ～．三井化学株式会社、東京、2022 年 9 月 13 日

田畑泰彦　バイオマテリアルを用いた再生医療の世界．　九州歯科大学歯学部　大学院特別講義、福岡、2022 年 9 月 24 日

田畑泰彦　細胞機能を高めるバイオテクノロジーとして再生医療を考える．ライブセッション in 再生医療①、神戸、2022 年 9 月 27 日

田畑泰彦　バイオマテリアルを用いた再生医療．大阪大学歯学部 3 年生歯科理工学特別講義、大阪、2022 年 9 月 29 日

田畑泰彦　細胞機能を高めるバイオテクノロジーとして再生医療を考える．ライブセッション in 再生医療②、京都、2022 年 10 月 18 日

田畑泰彦　再生医療関連ビジネスは細胞に対するバイオテクノロジー分野から始まる．ウェルネスシンポジウム～細胞バイオテクノロジーの観点から再生医療関連ビジネスを再考してみるのは面白い～、京都、2022 年 12 月 14 日

田畑泰彦　DDS の基礎と応用、細胞分野の最先端情報 . 学校法人佐藤学園　大阪バイオメディカル専門学校　特別講義、大阪、2023 年 2 月 7 日

田畑泰彦　材料技術から見た再生医療の最新動向について . ライフサイエンス講座、京都工業会、京都、2023 年 3 月 8 日

田畑泰彦　細胞バイオテクノロジーとしての再生医療に必要な材料技術 . 企業講演、デンカ株式会社、東京、2023 年 2 月 8 日

田畑泰彦　 Biomaterial Application to Regenerative Medicine as Cell Bio-technology. 企業講演　デンカ株式会社、シンガポール、2023 年 2 月 28 日 -3 月 2 日

田畑泰彦　材料技術から見た再生医療の最新動向について . ライフサイエンス講座、公益社団法人京都工業会、オンライン、2023 年 3 月 8 日

田畑泰彦　バイオマテリアルの「柔らかイイ話」. ライフサイエンスバイオマテリアル研究会　新田ゼラチン株式会社、2023 年 3 月 17 日

田畑泰彦　オートファジー可視化のための高分子ナノ粒子を用いた核酸の細胞内徐 . 公益財団法人日本化学繊維研究所　第 80 回講演会、京都大学桂キャンパス、2022 年 11 月 8 日

田畑泰彦　ライフサイエンスにおいてますます広がるゼラチンの有用性 . ライフサイエンスバイオマテリアル研究会　新田ゼラチン株式会社、2022 年 10 月 19 日

田畑泰彦　最先端医療を支えるバイオマテリアル .　神戸大学大学院　特別講義、神戸、2022 年 12 月 22 日

田畑泰彦　再生医療の定義と人胎盤抽出物への期待 . 企業講演、株式会社　日本生物製剤、福岡県久留米市、2022 年 7 月 14 日

田畑泰彦　細胞周辺環境を作り与える組織工学技術が再生医療の将来を拓く . 第 43 回日本炎症・再生医学会、兵庫県立 淡路夢舞台国際会議場、2022 年 7 月 6 日・7 日

国内での一般演題

田畑泰彦　生体機能性高分子 - からだを治すポリマー -（生物医学研究から先端医療を支える高分子技術）. KIPS 高分子講座、オンライン、2022 年 2 月 10 日

田畑泰彦　歯の治療学 .　九州歯科大学歯学部講義、福岡、2022 年 6 月 4 日

田畑泰彦　再生医科学 .　同志社大学生命医科学講義、WEB、2022 年 7 月 9 日

黒田龍郎、関根宗一郎、田倉章皓、田畑泰彦　形状制御と表面修飾が容易な貴金属面を有する 3 次元細胞培養足場の作製および評価、第 22 回再生医療学会総会、京都、2023 年 3 月 23-25 日

Wenxuan, Y., 城　潤一郎、田畑泰彦　細胞機能可視化のためのモレキュラービーコンの細胞内徐放とリバーストランスフェクションの組み合わせ .　第 38 回日本 DDS 学会学術集会、オンライン、2022 年 6 月 29-30 日

Wenxuan, Y., 城　潤一郎、田畑泰彦　Design of reverse transfection system with cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon to visualize cell functions.　2022KIPS 高分子若手シンポジウム、京都、2022 年 10 月 25 日

Wenxuan, Y., 阿部哲士、田畑泰彦　Design of cationized gelatin nanospheres as a carrier for mitochondria transplantation.　第 44 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2022 年 11 月 21-22 日

安藤　満、田畑泰彦　血小板膜被覆ゼラチンナノ粒子の調製と機能評価 .　第 44 回日本バイオマテリアル学会大会 , 東京 , 2022 年 11 月 21 – 22 日

安藤　満、佐々木善浩、秋吉一成　カチオン性リポソーム膜への膜タンパク質の再構成 .　第 38 回日本 DDS 学会学術集会 , オンライン , 2022 年 6 月 29 - 30 日

鷲坂太一、田畑泰彦 単球のマクロファージ分化を可視化するモレキュラービーコン内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 . 第 38 回日本 DDS 学会学術集会、オンライン、2022 年 6 月 29-30 日

鷲坂太一、田畑泰彦、モレキュラービーコン内包カチオン化ゼラチンナノ粒子の作製とマクロファージ分化の可視化 . 2022 KIPS 高分子若手シンポジウム、京都、2022 年 10 月 17 日

鷲坂太一、田畑泰彦、モレキュラービーコン内包カチオン化ゼラチンナノ粒子によるマクロファージ分化可視化 . 第 44 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2022 年 11 月 21-22 日

鷲坂太一、田畑泰彦、モレキュラービーコン内包カチオン化ゼラチンナノ粒子による単球からマクロファージへの分化の可視化 . 第 2 回再生医療科学シンポジウム、東京、2022 年 12 月 2-3 日

鷲坂太一、田畑泰彦、モレキュラービーコン内包カチオン化ゼラチンナノ粒子を用いた細胞分化の可視化 . 第 12 回 DDS 再生医療研究会、神戸、2022 年 12 月 10 日

鷲坂太一、田畑泰彦、モレキュラービーコン内包カチオン化ゼラチンナノ粒子によるマクロファージ分化の経時的可視化技術 . 第 22 回再生医療学会総会、京都、2023 年 3 月 23-25 日

南光太郎、井上侑香、田畑泰彦 マクロファージ機能修飾のためのフィブリンハイドロゲルの調製 . 第 68 回高分子研究発表会（神戸）、神戸、2022 年 7 月 15 日

南光太郎、井上侑香、田畑泰彦 マクロファージ機能修飾のための硬さの異なるフィブリンハイドロゲルの調製 .　第 44 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2022 年 11 月 21-22 日

南光太郎、井上侑香、田畑泰彦 抗炎症性マクロファージ誘導能の異なるフィブリンハイドロゲルの調製 .　第 22 回日本再生医療学会総会、京都、2023 年 3 月 23-25 日

松野久美子、早乙女俊樹、中村耕一郎、島田直樹、延谷公昭、田畑泰彦　塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を徐放できるゼラチンハイドロゲル不織布（Genocel）細胞　足場 .　第 21 回日本再生医療学会総会、オンライン、2022 年 3 月 17-19 日

松野久美子、島田直樹、延谷公昭、早乙女俊樹、田畑泰彦　塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）の徐放化ゼラチンハイドロゲル不織布細胞足場（Genocel）の調製 .　第 38 回日本 DDS 学会学術集会、オンライン、2022 年 6 月 29-30 日

松野久美子、早乙女俊樹、島田直樹、延谷公昭、田畑泰彦　組織修復材としてのゼラチンハイドロゲル不織布 Genocel ® の有用性 .　第 44 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2022 年 11 月 21-22 日

松野久美子、早乙女俊樹、島田直樹、延谷公昭、田畑泰彦　細胞増殖因子の徐放能を持つ細胞外マトリックス（ECM）様足場 Genocel.　第 12 回 DDS 再生医療研究会、神戸、2022 年 12 月 10 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
助　教	永野　誠治	Assist. Prof.	Seiji Nagano

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（図1）。

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）血液細胞の進化的起源を辿る研究

臨床応用に向けた開発研究の他に基礎研究も進めた。まず背景について概説する。マウス造血前駆細胞の分化能をシングルセルレベルで解析した結果に基づいて、T 細胞、B 細胞、赤血球などの系列へ向かう途上の各種前駆細胞に食細胞（マクロファージなど）を生成する能力が付随するという造血モデル（ミエロイド基本型モデル）を提唱した（2001）。その文脈の中で、ミエロイド -T 前駆細胞の存在を実証し（Wada et al, Nature, 2008）、さらにミエロイド -T 前駆細胞が T 細胞系列に決定する過程を解明した（Ikawa et al, Science, 2010）。

このミエロイド細胞を血液細胞の基本型とするモデルは、血液細胞の進化の過程を反映しているのではと考えた。そこで、いろいろな生物種の様々な細胞の遺伝子発現を比較し、血液細胞の進化の痕跡を辿ることにした。マウス、ホヤ、カイメン、カプサスポラ（アメーバ様の真核単細胞生物）の各種組織の遺伝子発現を比較したところ、マウス、ホヤ、カイメンの食細胞は互いに類似しており、さらにカプサスポラとの類似性も示された（Nagahata et al, Blood, 2022）。また、共通して高発現している遺伝子として転写因子 CEBPa が同定された。さらに、CEBPa が有する「非食細胞系の前駆細胞を食細胞へ転換する能力」が、カプサスポラからマウスまで受け継がれてきたことが示された。以上より、動物の祖先が多細胞生物となった際に、CEBPa を発現することにより単細胞生物時代の形質を濃く引き継いだ細胞が体腔中に現れ、それが血液細胞の起源となったと考えられた（図 2）。

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（Fig. 1）.

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）Study on tracing the evolutionary origins of blood cells

In addition to development research for clinical application, basic research was also carried out. First, we will describe an overview of the background. Based on the analysis of the developmental potential of murine hematopoietic progenitor cells at the single-cell level, we have proposed a model of hematopoiesis（myeloid based model）, where the progenitor cells on their way to the T-cell, B-cell and erythrocyte lineages are accompanied by the potential to generate myeloid cells（e.g. macrophages）（2001）. In this context, we have demonstrated the existence of myeloid-T progenitors（Wada et al, Nature, 2008）, and further elucidated the process by which myeloid-T progenitors are determined to the T cell lineage（Ikawa et al, Science, 2010）.

We hypothesised that this model that consider myeloid cells as the basic type of blood cells might reflect the evolutionary process of blood cells. We therefore decided to trace the evolution of blood cells by comparing gene expression in various cells of different species. Comparison of gene expression in various tissues of mice, tunicates, sponges and capsaspora（amoeba-like eukaryotic unicellular organisms）showed

that phagocytes of mice, tunicates and sponges were similar to each other, and also to capsaspora（Nagahata et al, Blood, 2022）. The transcription factor CEBPα was also identified as a common, highly expressed gene. Furthermore, it was shown that the 'ability of CEBPα to convert non-phagocytic progenitors into phagocytes' was inherited from capsaspora to mice. These results suggest that when the ancestors of animals became multicellular organisms, cells expressing the CEBPα and carrying a high proportion of the traits of unicellular organisms appeared in the body cavity, which may have been the origin of blood cells（Fig. 2）.

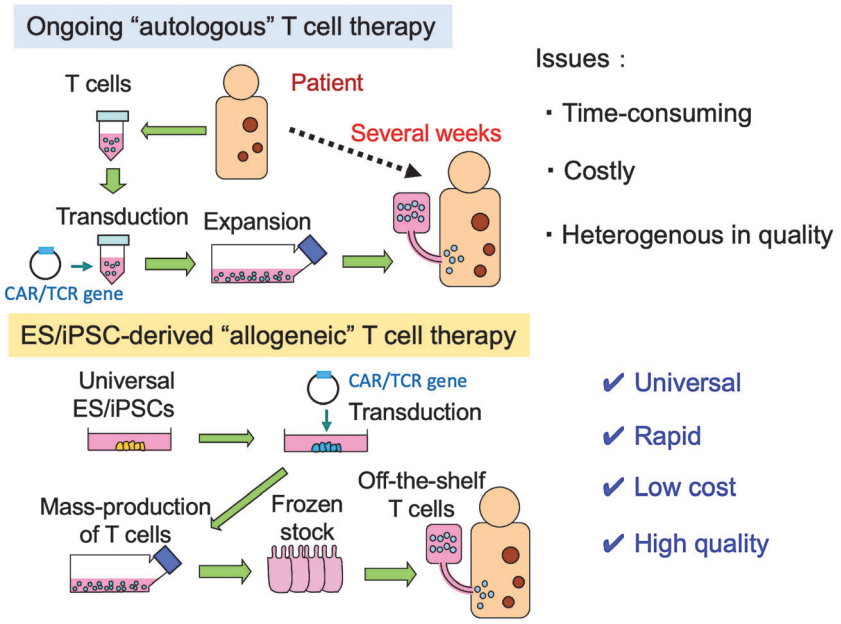


Figure 1　Development of off-the-shelf T cells to be used for the treatment of cancer

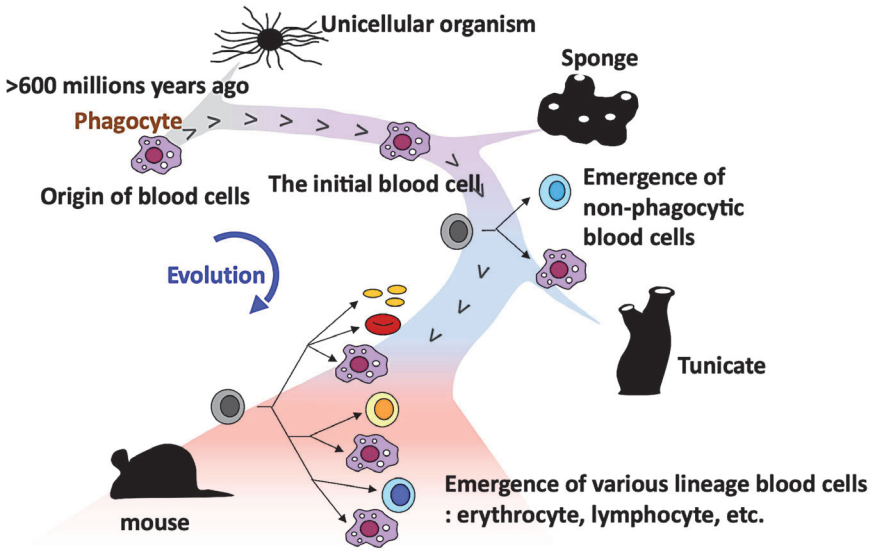


Figure 2　Origin of blood cells was shown to be macrophage-like phagocytes

List of Publications

Kato K, Inoue E, Tanaka S, Kawamoto H.（2022）. Increase in the incidence of acute inflammatory reactions to injectable fillers during COVID-19 era. **J Cosmet Dermatol.** *21（5）*:1816-1821.

Hidaka R, Miyazaki K, Miyazaki M*.（2022）. The E-Id axis instructs adaptive versus innate lineage cell fate choice and instructs regulatory T cell differentiation. **Frontiers in Immunology.** *13*:890056.

Tanaka A, Nakano TA, Nomura M, Yamazaki H, Bewersdorf JP, Mulet-Lazaro R, Hogg H, Liu B, Penson A, Yokoyama A, Zang W, Havermans M, Koizumi M, Hayashi Y, Cho H, Kanai A, Lee SC, Xiao M, Koike Y, Zhang Y, Fukumoto M, Aoyama Y, Konuma T, Kunimoto H, Inaba T, Nakajima H, Honda H, Kawamoto H, Delwel R, Abdel-Wahab O, Inoue D.（2022）. Aberrant EVI1 splicing contributes to EVI1-rearranged leukemia. **Blood.** *140（8）*:875-888.

Miyazaki M*, Miyazaki K.（2022）. The E-Id axis specifies adaptive and innate lymphoid lineage cell fates. **The Journal of Biochemistry**. *172（5）*:259-264.

Nagahata Y, Masuda K, Nishimura Y, Ikawa T, Kawaoka S, Kitawaki T, Nanya Y, Ogawa S, Suga H, Satou Y, Takaori-Kondo A, Kawamoto H.（2022）. Tracing the evolutionary history of blood cells to the unicellular ancestor of animals. **Blood.** *140（24）*:2611-2625.

河本宏（2022）. 総論 SARS-CoV-2 に対する免疫応答　**小児内科**　*54（1）*, 23-31.

河本宏（2022）. iPS 細胞技術を用いたがん免疫細胞療法　**がん免疫ペディア** 48-50.

河本宏、増田喬子、永野誠治（2022）. iPS 細胞から再生した T 細胞を用いたがん免疫療法－即納型汎用性 T 細胞製剤の開発－　**医学のあゆみ**　*281（5）*, 523-531.

河本宏（2022）. 自然免疫と獲得免疫　**臨床検査**　*66（5）*, 572-580.

河本宏（2023）. 免疫応答の仕組み：自然免疫と獲得免疫の連携　**アレルギーの臨床**　*43（2）*, 31-34.

河本宏（2023）. 遺伝子改変 T 細胞療法の現状と課題　**炎症と免疫**　*31（2）*, 82-86.

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. 12th AACR-JCA Joint Conference: Breakthroughs in Cancer Research: Translating Knowledge into Practice. Maui, Hawaii, December 10-14, 2022.

Miyazaki, M. Single-cell multiome analysis unravels the spatiotemporal regulation of lineage-specific transcription factors mediated by E2A and Notch signal at the developmental bifurcation between T cell and innate lymphoid cells. FASEB conference, Molecular Mechanisms of Immune Cell Development and Function. Nova Scotia, Canada, July 31st-Aug 4th, 2022.

Nagahata, Y. Tracing the evolutionary history of blood cells to the unicellular ancestor of animals. The 28th East Asia Joint Symposium. Online, October 26-28, 2022

Kawamoto, H. Development of “TCR cassette method”: a new method to transduce pluripotent stem cells with exogenous TCR gene. ThymOz 9. Australia, March 22-26, 2023.

Nagahata, Y., Kawamoto, H. Tracing the evolutionary history of blood cells to the unicellular ancestor of animals. ThymOz 9. Australia, March 22-26, 2023

河本宏　即納型 T 細胞製剤によるがん免疫療法の開発　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、Web、2022 年 3 月 9 日

河本宏　iPS 細胞由来キラー T 細胞を用いた COVID-19 治療法の開発　第 21 回日本再生医療学会総会、Web、2022 年 3 月 17-19 日

河本宏　TCR カセット法の開発：iPS 細胞に安全かつ簡便に TCR 遺伝子を導入　第 21 回日本再生医療学会総会、Web、2022 年 3 月 17-19 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制御法の開発　第 21 回日本再生医療学会総会、Web、2022 年 3 月 17-19 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－　大阪大学先導的学際研究機構　生命医科学融合フロンティア研究部門シンポジウム、大阪・Web、2022 年 3 月 28 日

河本宏　腫瘍免疫のいまと今後の展望～ iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の作製～　第 19 回泌尿器科再建再生研究会、秋田、2022 年 6 月 4 日

河本宏　T 細胞を知る、創る　2022（令和 4 年）金沢大学十全医学会学術集会、金沢、2022 年 6 月 14 日

河本宏　アレルギーが起こる仕組み：そもそも何のためにある反応？自己免疫疾患との違いは？第 38 回日本小児臨床アレルギー学会、東京・Web、2022 年 7 月 2-3 日

河本宏　iPS 細胞由来キラー T 細胞を用いた COVID-19 治療法の開発　第 43 回日本炎症・再生医学会、淡路、2022 年 7 月 6-7 日

河本宏　細胞医薬の時代の到来：iPS 細胞を材料とした汎用性即納型 T 細胞製剤によるがん免疫療法の開発　第 26 回日本がん免疫学会総会、島根、2022 年 7 月 20-22 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 42 回阿蘇シンポジウム、熊本・Web、2022 年 7 月 22-23 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－腫瘍浸潤 T 細胞の再生に向けて－シンポジウム 免疫チェックポイント阻害剤 －現在（いま）そして未来－、東京、2022 年 9 月 2 日

河本宏　Development of off-the-shelf universal T cells derived from iPS cells.　第 81 回日本癌学会学術総会、横浜、2022 年 9 月 29 日－10 月 1 日

河本宏　腫瘍免疫における合成生物学の潮流 S03 Overview Talk　第 51 回日本免疫学会学術集会、熊本、2022 年 12 月 7－9 日

河本宏　再生医療と免疫 E06 ショートトーク　第 51 回日本免疫学会学術集会、熊本、2022 年 12 月 7－9 日

Miyazaki, M. To B, or not to B. That is the question. The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Symposia. Kumamoto, Dec 7-9. 2022.

河本宏　血液細胞の進化的起源をたどるとマクロファージ様の単細胞生物にまで遡れた　第 7 回日本骨免疫学会ウィンタースクール、長野、2023 年 1 月 31－2 月 3 日

長畑洋佑　カタユウレイボヤを用いて動物の血液細胞の進化過程を探る　ナショナルバイオリソースプロジェクト主催シンポジウム「バイオリソースで解決する 21 世紀の社会課題」東京、2023 年 2 月 21 日

河本宏　SARS-Cov-2 と HLA　第 21 回日本組織適合性学会近畿地方会、大阪、2023 年 3 月 18 日

永野誠治　ゲノム編集を用いて作製した TCR-iPS 細胞から誘導した抗原特異的 CTL：TCR カセット法　第 22 回日本再生医療学会総会　京都、2023 年 3 月 23-25 日

河本宏　細胞を薬のように使う時代が到来－T 細胞製剤でがんやウイルス感染症を治す－　令和 4 年度「感染・免疫・がん・炎症」全国共同研究拠点シンポジウム、北海道、2023 年 3 月 29 日

Miyazaki, M. A Journey to find the way to adaptive immunity. Kyoto T cell Conference, virtual meeting, May 28th, 2022.

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 31 回 Kyoto T Cell Conference、Web、2022 年 5 月 27-28 日

長畑洋佑、貝谷亮太、増田喬子、河本宏　無脊椎動物における T 細胞の起源　第 31 回 Kyoto T Cell Conference、Web、2022 年 5 月 27-28 日

永野誠治、寺田晃士、縣保年、増田喬子、河本宏　ゲノム編集を用いて作製した TCR-iPS 細胞から誘導した抗原特異的 CTL：TCR カセット法の開発　第 26 回日本がん免疫学会総会、島根、2022 年 7 月 20－22 日

永野誠治、寺田晃士、縣保年、河本宏　ゲノム編集を用いて作製した TCR-iPS 細胞から誘導した抗原特異的 CTL：TCR カセット法の開発　第 84 回日本血液学会学術集会、福岡、2022 年 10 月 14－16 日

Miyazaki, K., Kawamoto, H., Miyazaki, M. Synergistic action between E2A and Notch signal determines the cell fate of T cell versus innate lymphoid cells in the thymus. The 51st Annual Meeting of the Japanese

Society for Immunology. Kumamoto, December 7-9, 2022.

永野誠治、寺田晃士、縣保年、河本宏　Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method　第 51 回日本免疫学会学術集会、熊本、2022 年 12 月 7－9 日

長畑洋佑、貝谷亮太、佐藤ゆたか、河本宏 Tracing the evolutionary history of T cells back to invertebrates. 第 51 回日本免疫学会学術集会、熊本、2022 年 12 月 7－9 日

Nishimura, Y., Nagahata, Y., and Kawamoto, H. Polyclonal Tregs have a therapeutic potency after autoimmune disease onset.（The Best Poster Award）The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kumamoto, Japan, December 7-9, 2022

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

多細胞生物では、細胞間・組織間、あるいは臓器間での様々な相互作用による制御を介して、発生・再生や恒常性維持が行なわれている。近年は、臓器レベルでのそのような制御が「臓器連関」として重要視され、それを担う増殖因子やサイトカインなどが次々と解明されつつある。私達のグループは、骨格筋の発生・再生過程や心臓の形態形成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として、細胞間シグナリング・接着制御に関わる ADAM プロテアーゼに関する研究を中心とする研究を行ってきた。ADAM プロテアーゼに関する最近の研究としては、心室中隔欠損の原因遺伝子の一つである ADAM19 が、膜型増殖因子であるグリア増殖因子の切断などに関与するだけでなく、BMP レセプターの切断にも関わり、腱前駆細胞の BMP シグナルに対する応答のタイミングを制御すること、それが心室中隔を構成する神経堤細胞の軟骨分化を抑制し、腱への分化を促すことを、明らかにしている（Arai H. et al., Cell Rep., 2019 など）。さらに、骨格筋は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が、謎の多いこの筋腱接合部の結合組織細胞分化に関与する因子として、転写因子 EBF3 を同定した（Kuriki M., et al., Development, 2000）。これらの発生機構の研究に加えて、私たちは骨格筋の恒常性維持機構の研究も進めてきた。その一つが、組織幹細胞である筋衛星細胞による筋再生機構の研究であり、もう一つが、宇宙滞在に伴う筋萎縮機構の研究である。骨格筋の維持に、運動に加えて重力負荷が必要であることは、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から初めて示唆され、その後も、数週間宇宙滞在した宇宙飛行士たちの骨格筋が萎縮することからわかってきたのだが、現在のところ、そのメカニズムはよくわかっていない。

骨格筋の重力負荷依存性の研究は国際宇宙ステーション（ＩＳＳ）で行う必要があるため、私たちは JAXA と協力して 10 年以上前からその研究に取り組んできた。しかし、この研究は、いくつかの「リスク」を伴うものであった。（1）ISS への打ち上げに加えて、船内での実験は宇宙飛行士の方々にお願いせねばならず、時間的・物理的制限を伴う。（2）実験の機会が限られることから、実験科学として必須の「再現性」を示すのに時間を要する。（3）船内汚染を防ぐために船内では血液やホルマリンなどの固定液の飛沫化を伴う実験はできない。（4）そもそも研究が進まない大きな原因の一つは、宇宙では体が浮いてしまう結果、動物は運動不足になるため、筋萎縮が重力負荷の欠如によるものか、運動量低下に起因するものか、判別が難しいことにある。（5）ISS 船内は宇宙放射線に晒されていて、実験動物もその影響下にあることを考慮せねばならない。問題（3）のために、マウスをはじめとするこれまでの動物を用いた多くの宇宙実験は、宇宙で一定期間飼育し、帰還後に解剖して解析が行われてきた。

幸運にも、我々はこれまでに2回の宇宙実験のチャンスを得た。そして、帰還後ではなく、宇宙で何が起こっているのかを知るため、実験動物として、船内で固定可能な小型魚類ゼブラフィッシュを用いた。閉鎖・循環型の水槽で魚を飼育し、カメラを設置して運動の質・量を測定した結果、ゼブラフィッシュは無重力に対し見事な適応能力を示し、運動量は地上コントロールとほとんど同じであることを見出しており（未発表)、(4）の問題をほぼクリアすることができた。また密封状態での固定方法を検討し、船内固定と帰還後固定の transcriptome データを得ることによって、宇宙滞在による変化と、帰還後の変化を捉えることに成功した。(5）の問題が最も厄介なのだが、2度目の宇宙実験では、宇宙で 1*g* 環境を作り出し、μg と比較する実験を行った。両者を同じ庫内で飼育することによって、同等の宇宙線量環境を作り出したのである。地上での実験として simulated microgravity での実験も行い、宇宙データと比較検討中である。もうすぐ、骨格筋維持の重力依存性を証明することができると考えている。

Our group, together with JAXA, is trying to answer a key question how skeletal muscle atrophy occurs under microgravity using zebrafish as a vertebrate model in our project named “Zebrafish Muscle”. Transcriptome analyses were performed by collaborating with Fumio Matsuzaki’s group in Kobe Riken（current affiliation: Medical Innovation Center of Kyoto University）and Yutaka Suzuki’s group in the University of Tokyo. All the obtained transcriptome data will elucidate effects of microgravity on skeletal muscle at transcriptional level and discuss mechanistic insights into roles of gravity in the maintenance of skeletal muscle.

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

本分野では、がんに起因する宿主の病態生理に関する研究やアバターやデバイスの利用が生体に与える影響に関する研究に取り組んできた。本年度は、宿主のニコチンアミドメチル基転移酵素（NNMT）ががんに起因する肝臓の代謝異常に関わる因子であることを報告した。脂質代謝における NNMT の機能についても明らかにした。また、遠隔に存在するがんによって肝臓の空間的な機能制御が破綻することを見出し、急性期応答と炎症の関係性を明らかにした。以上の研究によって、がんが個体の全身状態を悪化させるメカニズムの一端を明らかにできた。

1）がん個体の肝臓の病態生理における NNMT の機能

マウスに乳がんや大腸がんなどのがん細胞を移植すると、遠隔にある肝臓にさまざまな変化が生じる。本分野では担がん個体の肝臓に対するマルチオミクス解析を行い、その性状を分析してきた。その過程で、担がん個体の肝臓ではニコチンアミドメチル基転移酵素（NNMT）をコードする mRNA 量が増加することが明らかとなった。公共のデータベースを用いた解析から遺伝学的にがんを誘発するマウスモデルでも同様の現象が観察された。NNMT は S- アデノシルメチオニンとニコチンアミドから S- アデノシルホモシステインとメチルニコチンアミドを生成する酵素である。そこで、これらの代謝物の量を正常個体と担がん個体で比較したところ、がんによってメチルニコチンアミドが増加することがわかった。NNMT・メチルニコチンアミドの増加が肝臓にどのような影響を与えるのかを明らかにするために NNMT 欠損マウスを作製した。NNMT 欠損マウスではメチルニコチンアミドが完全に消失した。野生型マウスと NNMT 欠損マウスの肝臓に対するメタボローム解析の結果、がんによって肝臓のアミノ酸代謝、ウレア回路、ウラシル代謝に変容が生じており、これらの変容が NNMT 欠損によって緩和されることが判明した。すなわち、がんが、宿主の NNMT を介してこれらの代謝経路を撹乱していると考えられた。ウレア回路は有毒なアンモニアを無毒なウレアへと変換する重要な代謝回路であり、ウレア回路の異常は全身の恒常性に影響しうる。実際、担がん個体では体重の減少や行動量の低下など、全身性の変容が観察される。現時点では肝臓の異常と全身性の異常の因果関係は明らかではなく、今後の重要な課題である。

上記研究に加えて、NNMT の培養肝細胞における機能解析を実施した。マウスの肝細胞培養株 AML12 において NNMT をノックダウンしたところ、S- アデノシルメチオニンが増加、メチルニコチンアミドが減少し、中性脂質量が減少した。中性脂質の減少が何に起因するのかを明らかにするために、シクロロイシン処理によって S- アデノシルメチオニン合成を阻害した。その結果、NNMT のノックダウンによる S- アデノシルメチオニンの蓄積が緩和され、中性脂質が減少しなくなった。

以上のことから、本細胞においては、NNMT が S- アデノシルメチオニンの恒常性制御を介して中性脂質代謝に関与することが明らかとなった。

2）がん個体の肝臓における空間的遺伝子発現制御の破綻

肝臓における遺伝子発現は空間的に制御されており、これを zonation（ゾネーション）という。より具体的には、門脈付近に位置する肝細胞は栄養や酸素の供給を受けてエネルギー代謝系の遺伝子（例 : アルブミン（*Albumin*））を活発に発現する。一方で、中心静脈付近に位置する肝細胞は解毒系の遺伝子（例 : *Cyp2e1*）を活発に発現する。肝臓のゾネーションは肝臓の恒常性維持ならびに適切な機能発現にとって極めて重要で、さまざまな疾患が肝臓のゾネーションの破綻を呈することが知られている。本研究では、空間トランスクリプトーム解析によって正常マウスと担がんマウスの肝臓の空間的遺伝子発現パターンを網羅的に調べた。まず、担がん個体の肝臓であっても、*Albumin* や *Cyp2e1* といった主要なマーカーで規定されるゾネーションは維持される、ということがわかった。一方で、生物学的経路ごとに多様な撹乱が観察されることを見出した。例えば、解毒系代謝経路は中心静脈近傍の肝細胞で活発であるが、担がんマウスの肝臓ではそのようなゾネーションがほぼ消失していた。また、担がんマウスの肝臓では急性期応答が活性化される。興味深いことにその活性のパターンには偏りがあり、*Albumin* を高発現する肝細胞でより強い活性化が認められた。エネルギー代謝を担う肝細胞が急性期応答へとその役割をスイッチしたのではないかと考えている。加えて、担がん個体の肝臓には好中球などの自然免疫細胞が浸潤する。興味深いことにその浸潤部位に偏りがあり、門脈と中心静脈の間に位置する部位に活性化した好中球が多いようであった。そのメカニズムや病態生理的な意義は現在未解明であるが、この情報を基盤として今後の研究を展開していく予定である。なお、本研究は、医生物学研究所 Alexis Vandenbon 准教授との共同研究である。

This laboratory aims to understand the mechanisms of host pathophysiology in cancers and how the use of avatars and devices affects human physiology. In this fiscal year, we revealed that remote solid cancers rewire liver metabolism via host nicotinamide-N-methyltransferase（NNMT）. We also found that solid cancers disrupt spatial gene expression（i.e., zonation）in the liver. Furthermore, we investigated the relationship between acute phase response and liver inflammation. Overall, we unraveled the mechanisms underlying host pathophysiology in cancers.

1）Remote solid cancers rewire liver metabolism via host NNMT

Transplantation of cancer cells into mice causes various alterations in the host livers. We have been analyzing the livers of cancer-bearing animals using multi-omics analyses. During our analyses, we noted that the expression of *Nnmt* in the liver was elevated in cancer-bearing mice. NNMT is an enzyme that methylates nicotinamide to produce 1-methyl-nicotinamide. A methyl group is from S-adenosylmethionine. We confirmed that solid cancers remotely increased 1-methyl-nicotinamide in the liver. To understand the

pathological significance of this up-regulation, we generated *Nnmt* KO mice, transplanted cancers to them, and analyzed the liver. A series of experiments demonstrated that cancer transplantation causes abnormalities in amino acid metabolism, urea cycle, and uracil biogenesis. Importantly, *Nnmt* KO ameliorated these abnormalities. The urea cycle is critical to detoxify ammonia, whose dysfunction is expected to disrupt homeostasis systemically. Indeed, we found that *Nnmt* KO at least in part ameliorated cancer-induced weight loss and reduction in the wheel-running activity. In summary, we identified NNMT as a novel host factor that mediates cancer's adverse effects on the host.

We also analyzed the function of NNMT in the AML12 mouse primary hepatocyte cell line. *Nnmt* RNAi in this cell line accumulated S-adenosyl-methionine and reduced 1-methyl-nicotinamide. *Nnmt* RNAi also resulted in the reduction of neutral lipids. To know whether S-adenosyl-methionine and 1-methyl-nicotinamide are involved in the regulation of neutral lipids in this cell line, we treated *Nnmt* RNAi AML12 cells with cycloleucine or 1-methyl-nicotinamide. Cycloleucine is an inhibitor for S-adenosyl-methionine biogenesis. We found that cycloleucine treatment buffered *Nnmt* RNAi-dependent reduction of neutral lipids, suggesting that NNMT regulates lipid metabolism via S-adenosyl-methionine in this cell line.

2）Remote solid cancers disrupt liver zonation

The liver plays a central role in metabolism. This role is closely related to a spatially organized tissue structure known as zonation, formed by repetitive hexagonal units called liver lobules. The lobules are associated with portal veins and central veins. Portal veins are at the junction of neighboring lobules, supplying nutrient- and oxygen-rich blood to nearby hepatocytes. Those hepatocytes are active for energy metabolism, consuming nutrients and oxygen. The consequently exhausted blood is then drained by central veins. In contrast to portal vein-associated hepatocytes, hepatocytes nearby central veins highly express xenobiotic metabolism genes. Using spatial transcriptome analysis, we recently found that murine breast cancers remotely disrupt liver zonation in various distinct manners depending on biological pathways. For example, aspartate metabolism and triglyceride catabolic processes retain relatively intact zonation patterns, but the zonation of xenobiotic catabolic process genes exhibits a strong disruption. Acute phase response appeared enriched for *Albumin*-high hepatocytes. Such complexly rewired zonation might account for cancer-dependent pathophysiology in the liver, establishing a basis for better understanding of host pathophysiology in cancers.

List of Publications

Yoda, M., Mizuno, R., Izumi, Y., Takahashi, M., Bamba, T., and Kawaoka, S.（2023）. Nicotinamide-N-methyltransferase regulates lipid metabolism via SAM and 1-methylnicotinamide in the AML12 hepatocyte cell line. J Biochem. 10.1093/jb/mvad028.

He, C., Konishi, R., Harata, A., Nakamura, Y., Mizuno, R., Yoda, M., Toi, M., Kawaguchi, K., and Kawaoka, S.（2023）. Serum amyloid alpha 1-2 are not required for liver inflammation in the 4T1 murine breast

cancer model. Front Immunol *14*, 1097788. 10.3389/fimmu.2023.1097788.

Vandenbon, A., Mizuno, R., Konishi, R., Onishi, M., Masuda, K., Kobayashi, Y., Kawamoto, H., Suzuki, A., He, C., Nakamura, Y., et al.（2023）. Murine breast cancers disorganize the liver transcriptome in a zonated manner. Commun Biol *6*, 97. 10.1038/s42003-023-04479-w.

Mizuno, R., Hojo, H., Takahashi, M., Kashio, S., Enya, S., Nakao, M., Konishi, R., Yoda, M., Harata, A., Hamanishi, J., et al.（2022）. Remote solid cancers rewire hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide-N-methyltransferase. Nat Commun *13*, 3346. 10.1038/s41467-022-30926-z.

小西理予、河岡慎平 .（2023）. エンハンサー RNA. 脳科学辞典 .

河岡慎平 .（2023）. がんが宿主の肝臓に異常をもたらすメカニズム . 医学のあゆみ . 284:23805-23806.

河岡慎平 .（2023）. がんに起因する宿主の病態生理に関わる代謝メカニズム . 生化学 . 95: 91-95.

List of Presentations

河岡慎平. Remote solid cancers rewire hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide-*N*-methytranseferase. 第 159 回 東北大学加齢医学研究所 集談会 2023 年 2 月 10 日 .

河岡慎平 . マルチオミクス解析を活用して生体の状態を探る . 第 5 回アバター技術社会実装交流会 2023 年 1 月 25 日 .

河岡慎平 . 異分野融合研究の成功の必要条件を考える . 日本分子生物学会 フォーラム「異分野融合研究による創発～展望と課題」2022 年 12 月 1 日 .

河岡慎平 . がんに起因する宿主の代謝異常のメカニズムに関する研究 . 日本生化学会 2022 年 11 月 11 日 .

河岡慎平 . がんに起因する宿主の病態生理に関する研究 . 東北大学 がん医学コアセミナー 2022 年 10 月 13 日 .

河岡慎平 . デバイスの利用は私たちにどのような影響を与えるのか？マルチオミクス解析を用いたアプローチ . 日本ロボット学会 フォーラム「アバター共生社会」2022 年 9 月 9 日 .

Shinpei Kawaoka. Multi-omics analyses to understand how the use of robots and avatars affects humans. International conference on Robotics and Automation 2023-WS. May. 29. 2023.

Shinpei Kawaoka. Introduction into integrative bioanalytics. Online Workshop for Joint Research between NTU and Tohoku. Apr. 14. 2023.

Shinpei Kawaoka. Multi-omics analyses to understand how the use of robots and avatars affects humans. International conference of Social Robots 2022-WS. Dec. 13. 2022.

Shinpei Kawaoka. Enhancer regulation of hepatic aerobic respiration. Redox week in Sendai. Oct 31. 2022.

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

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解明し、それに基づく新規治療法の開発を目指している。現在、以下の研究テーマにとりこんでいる。

1. 間葉系幹細胞に関する研究

骨髄間質細胞の中には、間葉系組織に分化し、組織の再生・修復機能を担う間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cell、MSC）が存在しているとされている。しかし MSC の本質に関して未解決な点が多く、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、その更なる理解が不可欠である。我々は京都大学医学部整形外科教室との共同研究として、骨髄由来 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 細胞の分化誘導を行い、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、医生物学研究所安達研究室との共同研究により、共焦点蛍光顕微鏡を用いて骨様結節の形成過程を可視化した。更に、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、骨芽細胞から骨細胞への分化過程を解析した。その結果、TGFβ シグナルが骨芽細胞の表現型を維持し、その低下が骨細胞への分化に重要であることを明らかにした（Fig 1）。

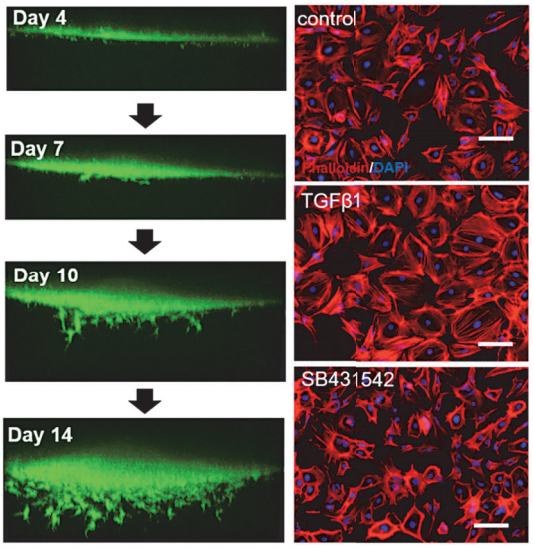


Fig 1. (Left) Dynamic behavior of GFP-labeled iPSCs during 3D-osteogenic induction. (Right) Effect of TGFβ signal on osteogenic-induced iPSC.

軟骨に関しては、沿軸中胚葉から体節を経て、軟骨細胞を誘導し、マウスの皮下に移植することで、成長板軟骨様構造を形成するに成功した。更に、CRISPR/Cas9 遺伝子編集により作製した COL10A1 ノックアウト iPS 細胞を樹立し、軟骨細胞の肥大化や内軟骨性骨化に COL10A1 は非必須であることを証明した（Fig 2）。

2）疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と創薬

遺伝性の骨軟骨系疾患の多くは病態が不明で有効な治療法が確立されていない。特定の個人から樹立した疾患特異的 iPS 細胞の特質を利用して、近年、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一つであり、ACVR1 遺伝子の変異が原因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 シグナル阻害剤であるシロリムスが有効であることを見出した。しかし、mTOR シグナルは多数の下流因子を制御することから、現在、FOP 病態に関与する下流因子を同定する研究ならびに創薬研究を行っている。近年、マクロファージ等炎症性細胞が FOP の病態に関与することが報告されており、変異型 ACVR1 の炎症性細胞における影響を解明することにより、前駆細胞と炎症細胞の両方から病態を理解することが期待される。我々は FOP 特異的および変異修復（resFOP）iPS 細胞を単球に分化させ、解析を行った。その結果、変異型 ACVR1 は単球のプロ炎症性シグネチャーを引き起こすことが明らかになった（Fig 3）。

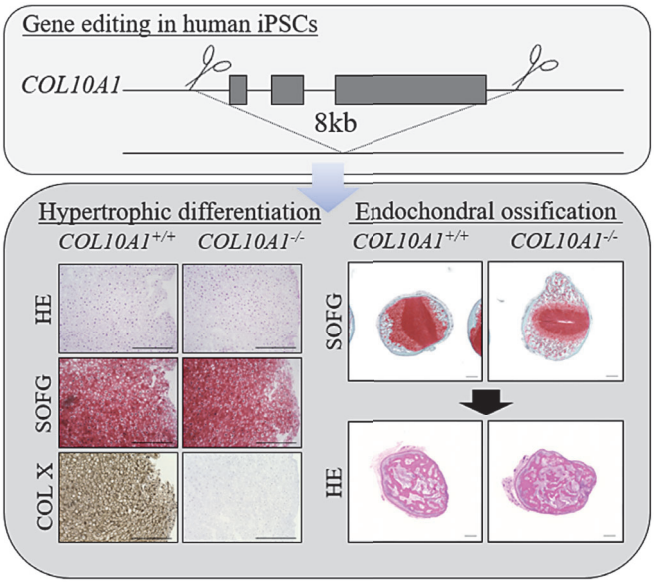


Fig 2. COL X is a hypertrophic chondrocyte-specific cartilage matrix protein, encoding by COL10A1 gene. Homozygous deletions of COL10A1 did not affect hypertrophic chondrocyte differentiation and endochondral ossification, indicating that COL X is dispensable for these biological processes.

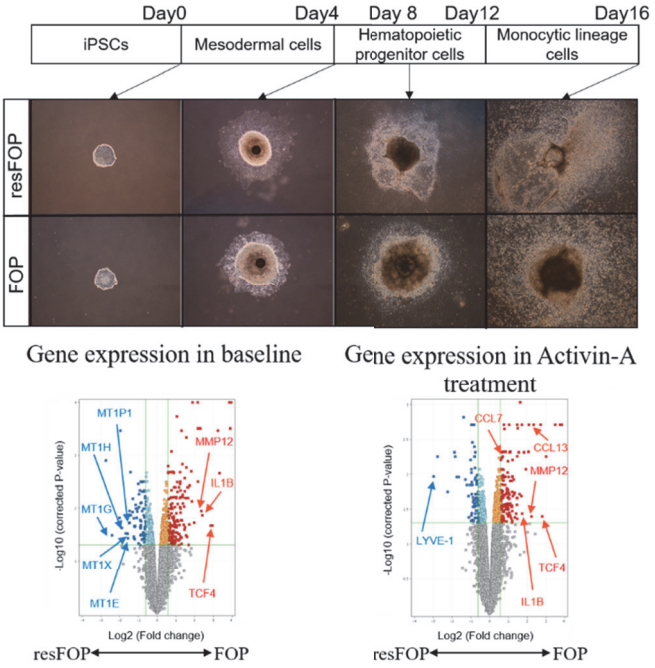


Fig 3. Monocytes were induced from FOP-iPSC or resFOP-iPSC. Gene expression was compared in baseline or after Activin-A treatment.

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、そのおお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 revealed that the TGFβ signal maintains the osteoblastic phenotype and the transition into osteocytes requires down-regulation of the TGFβ signal（Fig 1）.

As for chondrogenic differentiation, we established the method to induce hypertrophic chondrocytes and growth plate-like structure via paraxial mesoderm and somite. Moreover, through evaluation of COL10A1 knockout iPSC generated by CRISPR/Cas9 gene editing, we demonstrated that COL X is dispensable for the hypertrophic differentiation and endochondral ossification（Fig 2）.

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 progressiva（FOP）is one of such disease due to a mutation in ACVR1 gene. We have identified an mTOR inhibitor, rapamycin, as a candidate drug for FOP. Since mTOR signaling regulates several downstream factors, we are currently conducting study to identify which factor is critical for the pathogenesis of FOP as well as drug discovery research. Inflammatory cells such as macrophages have recently been reported to be involved in the pathogenesis of FOP. Understanding the effects of mutant ACVR1 on inflammatory cells is expected to help us understand the pathogenesis from both progenitor and inflammatory cell perspectives. We differentiated FOP-specific and mutation-rescue（resFOP）iPS cells into monocytes and analyzed them. Our results revealed that mutant ACVR1 causes a pro-inflammatory signature in monocytes（Fig 3）.

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

Maekawa, H., Jin, Y.H., Nishio, M., Kawai, S., Nagata, S., Kamakura, T., Yoshitomi, H., Niwa, A., Saito, M.K., Matsuda, S., and Toguchida, J.（2022）. Recapitulation of pro-inflammatory signature of monocytes with ACVR1A mutation using FOP patient-derived iPSCs. Orphanet J Rare Dis *17*. ARTN 364

Kawai, S., Sunaga, J., Nagata, S., Nishio, M., Fukuda, M., Kamakura, T., Sun, L., Jin, Y., Sakamoto, S.,

Watanabe, A., et al.（2023）. 3D osteogenic differentiation of human iPSCs reveals the role of TGFbeta signal in the transition from progenitors to osteoblasts and osteoblasts to osteocytes. Sci Rep *13*, 1094.

Kamakura, T., Jin, Y.H., Nishio, M., Nagata, S., Fukuda, M., Sun, L.P., Kawai, S., and Toguchida, J.（2023）. Collagen X Is Dispensable for Hypertrophic Differentiation and Endochondral Ossification of Human iPSC-Derived Chondrocytes. Jbmr Plus. ARTN e10737

List of Presentations

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 5 回日本サルコーマ治療研究学会学術集会、2022.02.04（京都）

鎌倉武史、西尾恵、永田早苗、金永輝、戸口田淳也：「Collagen X is dispensable for hypertrophic differentiation of human iPSC-derived chondrocytes in vitro」第 45 回日本分子生物学会年会、2022.12.01（横浜）

孫麗萍、金永輝、西尾恵、鎌倉武史、戸口田淳也：「New Therapeutic Approach Targeting Energy Metabolism of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva」第 45 回日本分子生物学会年会、2022.12.02（横浜）

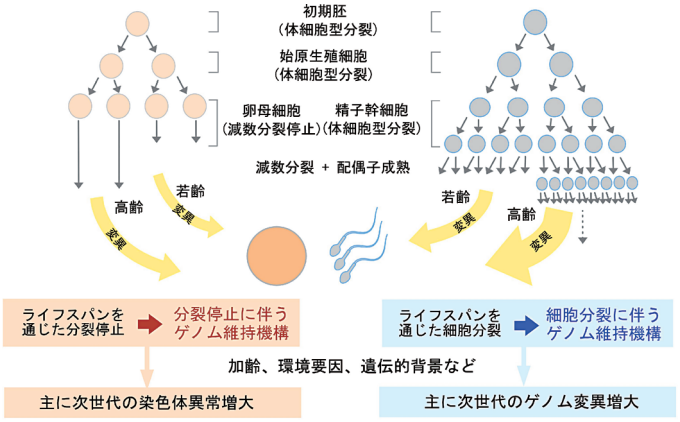
再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

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

准教授　中馬新一郎　Assoc. Prof.　Shinichiro Chuma

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ます。胚性多能性幹細胞や生殖幹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します。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ません。

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ます。特に、胚性多能性幹細胞や生殖幹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ます。また、当研究グループはヒト ES 細胞研究センター兼任となります。多能性幹細胞リソースの品質管理業務および新規技術開発を行います。



マウス生殖細胞のゲノム維持機構と次世代への影響を解明する

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

List of Presentation

中馬新一郎 .「臨床用ヒト ES 細胞株のゲノム・遺伝子発現解析」. 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 . ZOOM. 2022.3.9.

中馬新一郎 .「生殖系列サイクルにおける遺伝的安定性の発生制御」. 大阪大学・蛋白質研究所セミナー「生殖細胞・減数分裂制御の最前線」. ZOOM. 2022.3.12.

李京航 .「マウス ES 細胞の増殖分化を制御する転写因子群の CRISPRa スクリーニング」. 新学術領域「全能性プログラム」若手勉強会 . ZOOM. 2022.7.7.

Shinichiro Chuma. "Genomic stability of mouse spermatogonial stem cells in vitro". The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development" Fukuoka. 2021.11.23.

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

統合生体プロセス分野
Laboratory of Integrative Biological Science

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

当分野では、不妊症、免疫関連疾患の新規治療法開発を目指し、受精と自己免疫寛容維持の新規メカニズムの解明に焦点をあてた研究を展開している。本年度は、マウス精子が受精能を獲得する過程において重要な役割を担う新規 GPI アンカー型タンパク質の同定を試み、精子を機能的に二分する分子を同定した。一方、炎症性疾患または自己免疫疾患マウスモデルを用いて、炎症性サイトカインとその産生細胞の制御機構を解析している。炎症性サイトカイン産生細胞を可視化する実験モデルおよび新規の自己免疫疾患モデルの開発を進めた。

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同定

マウス精子は、段階的な成熟過程を経ることで受精能を獲得することが知られている。我々は、先行研究において受精能獲得過程にある精子の膜表面では GPI アンカー型タンパク質（GPI-AP）遊離とラフト局在変化が連動して起こり、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、精子を機能的に二分する分子の同定に成功した。

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、炎症性サイトカインの発現を可視化するためのレポーター系統の樹立とサイトカイン産生細胞の制御機構の解析を進めた。Bone marrow-derived dendritic cells を試験管内で刺激した時のレポーター分子発現の確認に加えて、マウスにさまざまな病原体成分および病原体感染刺激でレポーター分子の発現上昇が検証できた。

また、自己免疫性 T 細胞由来の T 細胞受容体を発現するマウス系統の作製を進め、CD4 T 細胞依

存性である複数の自然発症型疾患モデルマウスの樹立に成功した。

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 2020, we attempted to identify novel GPI-anchored proteins that play important roles in the process by which mouse sperm acquire fertility. Moreover, through the utilization of mouse models for inflammatory or autoimmune diseases, we conducted an investigation into the regulation of inflammatory cytokine expression and the cells responsible for its production. We focus the development of innovative models that enable the visualization of mononuclear cells actively secreting inflammatory cytokines, as well as those involved in CD4-dependent autoimmune disorders.

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

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

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

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

We successfully developed a reporter strain that enables the visualization of cells expressing an inflammatory cytokine. This reporter strain was utilized to investigate the regulatory mechanisms governing cytokine expression. To validate the functionality of the strain, we induced reporter expression in bone marrow-derived dendritic cells through stimulation with lipopolysaccharide or pathogen infection, as well as by exposing them to microbial components. Furthermore, we achieved the generation of a strain expressing a single T cell receptor derived from autoimmune T cells. This strain serves as a valuable model for studying spontaneous autoimmune disease, specifically mediated by CD4 T cells.

List of Publications

Lee S, **Hirota K**, Schuette V, Fujita T, Kato H. Attenuation of regulatory T cell function by type I IFN

signaling in an MDA5 gain-of-function mutant mouse model. ***Biochem Biophys Res Commun***. 629:171-175.（**2022**）

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***. 74:641-653.（**2022**）.

Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, **Watanabe H, Kondoh G,** Kageyama R, Yagita K. Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 119（1）:e2114083119.（**2022**）

Omatsu Y, Aiba S, Maeta T, Higaki K, Aoki K, **Watanabe H, Kondoh G,** Nishimura R, Takeda S, Chung UI, Nagasawa T. Runx1 and Runx2 inhibit fibrotic conversion of cellular niches for hematopoietic stem cells. ***Nature Communications.*** 13（1）:2654.（**2022**）

Yoshida K, Hada M, Kizu A, Kitada K, Eguchi-Kasai K, Kokubo T, Teramura T, Yano S, Suzuki HH, **Watanabe H**, **Kondoh G,** Nagamatsu A, Saganti P, Cucinotta FA, Morita T. Comparison of biological measurement and physical estimates of space radiation in the International Space Station. ***Heliyon***. 8（8）:e10266.（**2022**）

Tanaka A, Maeda S, Nomura T, Llamas-Covarrubias MA, Tanaka S, Jin L, Lim EL, Morikawa H, Kitagawa Y, Akizuki S, Ito Y, Fujimori C, **Hirota K**, Murase T, Hashimoto M, Higo J, Zamoyska R, Ueda R, Standley DM, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Construction of a T cell receptor signaling range for spontaneous development of autoimmune disease. ***J Exp Med.*** 220: e20220386.（**2023**）

Tsukita K, Kitamata M, Kashihara H, Yano T, Fujiwara I, Day TF, Katsuno T, Kim J, Takenaga F, Tanaka H, Park S, Miyata M, **Watanabe H, Kondoh G,** Takahashi R, Tamura A, Tsukita S. Phase separation of an actin nucleator by junctional microtubules regulates epithelial function. ***Science Advance*** 9（7）:eadf6358.（**2023**）

Hirano R, Okamoto K, Shinke M, Sato M, Watanabe S, **Watanabe H, Kondoh G,** Kadonosono T, Kizaka-Kondoh S. Tissue-resident macrophages are major tumor-associated macrophage resources, contributing to early TNBC development, recurrence, and metastases. ***Commun Biol.*** 6（1）:144.（**2023**）

Nakao S, Ito K, Sakoh K, Takemoto K, **Watanabe H**, **Kondoh G,** Irie T, Nakagata N, Takeo T. Dimethyl-α-cyclodextrin induces capacitation by removing phospholipids from the plasma membrane of mouse sperm. ***Biol Reprod.*** ioad013.（**2023**）

Nakao S, Ito K, Sugahara C, **Watanabe H**, **Kondoh G,** Nakagata N, Takeo T. Synchronization of the ovulation and copulation timings increased the number of in vivo fertilized oocytes in superovulated female mice. ***PLoS One.*** 18（2）: e0281330.（**2023**）

List of Presentations

Mukoyama H, Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Regulation and cell fate of CCR2 + inflammatory monocytes in the development of T cell-dependent autoimmune arthritis 第 51 回 日本免疫学会学術集会 , 2022 年 12 月

Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Differential TCR repertoire for joint self-antigens determines the functional balance between the regulatory T and arthritogenic T cells in T cell-mediated autoimmune arthritis 第 51 回 日本免疫学会学術集会 , 2022 年 12 月

Ohara D, **Watanabe H**, Takeuchi Y, LEE Y, Mukoyama H, **Kondoh G**, **Hirota K**. An Il23a-Venus reporter strain reveals the spatio-temporal regulation of IL-23- producing cDC2 subset in gut-associated lymphoid tissues 第 51 回 日本免疫学会学術集会 , 2022 年 12 月

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

病因免疫学分野
Laboratory of Immunopathogenesis

教　授　　伊藤　能永　　Prof.　　Yoshinaga Ito

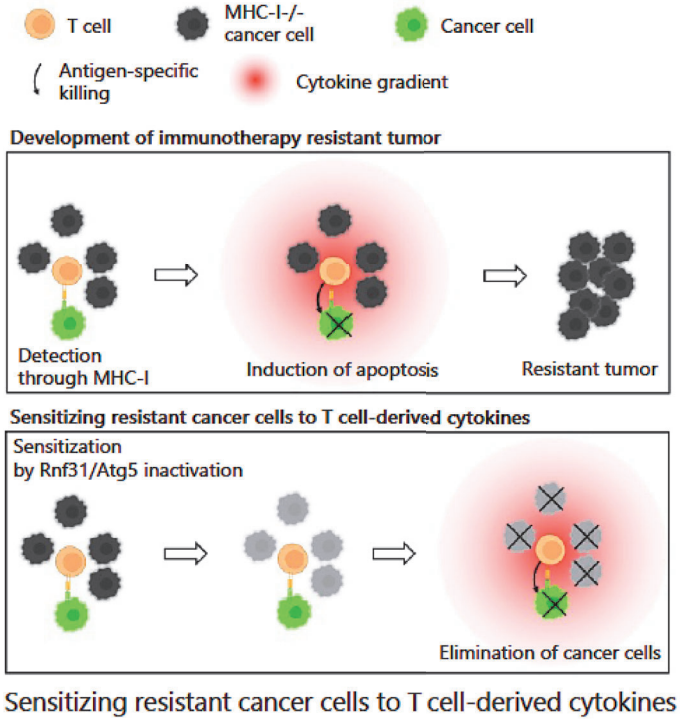
本分野では、自己組織に対する免疫応答機構の生理的な役割と、その破綻に起因する疾患の発症機構を明らかにすることをめざした研究を推進している。2022 年においては、T 細胞からのサイトカインに対する感受性を高めることが難治性がんに対する新規治療戦略となりうることを明らかにした。

がん組織内のがん細胞の多様性は、免疫療法を含むがん治療における大きな障壁となっている。例えば T 細胞は、がん細胞表面の MHC-I 分子に提示されたペプチドを認識しがん細胞を殺傷するが、それが選択圧となって MHC-I 欠損抵抗性がん細胞の増殖を促す。2023 年は、T 細胞による MHC-I 欠損抵抗性がん細胞の殺傷を可能にする分子経路がないか、ゲノムワイド CRISPR スクリーニングを用いて探索した。その結果、オートファジーと TNF シグナル経路を新規標的として見出した。これら経路の阻害により、MHC-I 欠損がん細胞が T 細胞由来サイトカインに対して感受性化しアポトーシス死することを示した。

1. 背景

がん組織には、単一患者由来のものであっても、遺伝的、あるいは非遺伝的な違いを有する多様ながん細胞が含まれている（腫瘍の不均一性）。このことは、治療に対する抵抗性の主な原因の一つである。すなわち、遺伝的不安定性などにより生み出された多様ながん細胞を含むがん組織に対して治療を行うと、多くの場合治療が強力な選択圧となって抵抗性がん細胞の割合が増加し、がん組織内で大半を占めるようになる。

T 細胞は腫瘍を殺傷する機能を持ち、がん免疫療法では中心的な役割を担う。T 細胞は、がん細胞表面上の MHC-I 分子によって提示されたがんペプチドを認識して T 細胞受容体を活性化し、パーフォリ



Sensitizing resistant cancer cells to T cell-derived cytokines

ンやグランザイムを含む細胞殺傷顆粒をがん細胞に向けて放出することでがん細胞を殺傷する。T細胞による腫瘍殺傷は、がん組織に対しては強力な選択圧として作用し、その結果 MHC-I 発現を低下あるいは失ったがん細胞の増加を引き起こす。細胞殺傷性 CD8 T 細胞の、T 細胞受容体を介した腫瘍細胞の認識は MHC-I 分子に依存しているため、このような MHC-I 欠損がん細胞は T 細胞には検知されない。このように MHC-I 欠損がんは T 細胞による免疫反応を逃れる代表的な抵抗性がんである。本研究では、MHC-I 欠損がん細胞を活性化 T 細胞の標的に変えうるような分子標的を明らかにすることを目的とした。

2. 研究手法・成果

感受性がん細胞と抵抗性がん細胞が混在したがん組織のモデルとして、T 細胞標的抗原である OVA を発現したがん細胞と、MHC-I 欠損がん細胞の共培養系を用意した。MHC-I 欠損がん細胞（Cas9 タンパクを強制発現）にゲノムワイドのガイド RNA ライブラリーを導入しておき、OVA 特異的活性化 T 細胞を共培養系に加えた。その結果、T 細胞標的抗原 OVA 発現がん細胞は OVA 特異的 T 細胞によって認識されパーフォリンやグランザイムにより殺傷される。T 細胞は周囲に大量のサイトカイン（IFNg や TNFa）を放出し、周囲に炎症環境を作り出す。周囲に存在する MHC-I 欠損がん細胞は T 細胞には認識されないが、炎症環境に対する感受性の違いによって数が増減する。このようなゲノムワイド CRISPR スクリーニングによって、MHC-I 欠損がん細胞の抵抗性に関連する遺伝子を明らかにした。その結果、TNF シグナル経路とオートファジーにそれぞれ関わる遺伝子が見つかってきた。

実際に Rnf31 遺伝子（TNF シグナル経路）と Atg5 遺伝子（オートファジー関連遺伝子）を遺伝子ノックアウトにより不活化すると、MHC-I 欠損がん細胞が T 細胞由来サイトカイン（IFNg と TNFa）に対して感受性化しアポトーシスによって死滅することを見出した。次にその分子機序の解明を試みた。オートファジーは、アポトーシスの機能分子である Caspase 8 を分解していた。そのためオートファジーを阻害することで、腫瘍細胞内でサイトカインによるアポトーシス誘導が増強されることが分かった。また RNF31 分子は、TNF シグナルを受けた細胞が生きるか、アポトーシスで死ぬかを決定するスイッチとして機能してすることが分かっている。実際に Rnf31 を失活させると MHC-I 欠損がん細胞は TNF シグナルによって Caspase 8 依存性の細胞死を起こした。また Rnf31 遺伝子と Atg5 遺伝子の両者を欠損させると、Caspase 8 の増加による相乗的なアポトーシス誘導効果があることを明らかにした。このようにしてアポトーシスに陥った MHC-I 欠損がん細胞は、樹状細胞によって T 細胞に対して効率よく交差提示され腫瘍に特異的な T 細胞を活性化、結果として腫瘍に浸潤する IFNg あるいは TNFa 産生 T 細胞数を増加させることが分かった。このように、抵抗性がん細胞内の TNF シグナル経路とオートファジーを不活性化することで、T 細胞由来の IFNg や TNFa による MHC-I 欠損がん細胞のアポトーシス誘導、アポトーシス細胞の交差提示増強、IFNg+TNFa 産生 T 細胞のさらなる腫瘍浸潤という、フィードフォワードループが形成されることが分かった。さらにマウスモデルを用いて、TNF シグナル経路とオートファジー双方を薬物あるいは遺伝子操作により阻害することで、MHC-I 欠損がん細胞を有するがんをコントロールできることを明らかにした。

We study an interplay between immune system and self-organs/tissues, with particular focus on its physiological roles and the mechanisms of disease development when the interaction becomes aberrant.

Tumor heterogeneity is a major barrier to cancer therapy, including immunotherapy. Activated T cells can efficiently kill tumor cells following recognition of MHC class I（MHC-I）–bound peptides, but this selection pressure favors outgrowth of MHC-I–deficient tumor cells. In 2022, we performed a genome-scale screen to discover alternative pathways for T cell–mediated killing of MHC-I–deficient tumor cells. Autophagy and TNF signaling emerged as top pathways, and inactivation of Rnf31（TNF signaling）and Atg5（autophagy）sensitized MHC-I–deficient tumor cells to apoptosis by T cell–derived cytokines. Mechanistic studies demonstrated that inhibition of autophagy amplified proapoptotic effects of cytokines in tumor cells. Antigens from apoptotic MHC-I–deficient tumor cells were efficiently cross-presented by dendritic cells, resulting in heightened tumor infiltration by IFNγ- and TNFα-producing T cells. Tumors with a substantial population of MHC-I–deficient cancer cells could be controlled by T cells when both pathways were targeted using genetic or pharmacologic approaches.

List of Publications

Ito Y（Corresponding authors）, Pan D, Zhang W, Zhang X, Juan TY, Pyrdol JW, Kyrysyuk O, Doench JG, Liu XS, Wucherpfennig KW.（2023）. Addressing Tumor Heterogeneity by Sensitizing Resistant Cancer Cells to T cell-Secreted Cytokines. **Cancer Discov.** 2023 May 4;13（5）:1186-1209. doi: 10.1158/2159-8290.CD-22-1125.

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

生体再建学分野
Laboratory of Experimental Immunology

客員教授	**坂口　志文**	**Visiting Prof.**	**Shimon Sakaguchi**
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。2022 年度、癌免疫における Treg の役割について研究を進めた。

癌組織では一般に、最終的に分化し、抑制能の高い effector Treg（eTreg）の著名な増加が見られ、有効な癌免疫応答を抑制していると考えられる（Sakaguchi et al., Ann Rev Immunol. 2020）。ヒトの免疫応答を制御する場合、単に Foxp3 発現 T 細胞として Treg 全体を標的にするのではなく、個々の Treg サブポピュレーションの機能、分化をコントロールすることで、より有効な免疫制御が可能になると考えられる。特に、癌組織では eTreg が殆どの Treg を占めるため、eTreg を特異的に除去できれば癌組織から Treg を除去でき、一方、正常リンパ組織、血液中では、eTreg を除去しても naïve Treg を保存できる。この結果、有効な癌免疫を惹起しつつ自己免疫を阻止できる。実際、eTreg はケモカインレセプター CCR4 を特異的に高発現しており、ADCC 活性の高い抗 CCR4 抗体で eTreg を除去し、重篤な自己免疫を伴わずに癌免疫応答を亢進させうる（Sugiyama et al., PNAS 2013）。同様に、抗 CTLA-4 抗体について ADCC 活性を強化すれば eTreg を特異的に除去でき、また抗原刺激を Treg 除去後に行えば、CTLA-4^{+} 活性化 CD8^{+} 細胞傷害性 T 細胞を傷害することなく、有効な癌免疫応答を誘導できる（Ha et al., PNAS 2019）。抗 PD-1 ブロッキング抗体は、Treg の増殖を促し、時に癌免疫応答を抑制するが、この場合も Treg 除去と併用すれば、より効果的な癌免疫応答を誘導できると考えられる（Kamada et al., PNAS 2019）。さらに、最近、当研究室では、癌組織内で増殖している Treg は癌関連抗原を認識していると考え、単一細胞 RNA シーケンス解析で 2 個以上が同一の TCR を発現する Treg 集団に特異的に発現する分子を探索した結果、ケモカインレセプター CCR8 を候補として見出した。実際、ADCC 活性の高い抗 CCR8 抗体は、増殖している Treg のみを癌組織でのみ除去し強い癌免疫応答を惹起できる（Kidani et al., PNAS 2022）。一方、その他の正常組織中の Treg を除去しないため自己免疫は誘導されなかった。現在､抗 CCR8 抗体による癌治療治験が進んでおり、新しい癌免疫療法として期待されている。

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

Tregs, which specifically express the transcription factor Foxp3, are actively engaged in the maintenance of immunological self-tolerance and homeostasis. They are abundant in tumor tissues, hampering effective anti-tumor immune responses; and their depletion is indeed able to evoke/enhance tumor immunity. However, one of the difficulties to specifically eliminate tumor Tregs by targeting a molecule expressed by Tregs is that a majority of such candidate molecules are commonly shared by tumor-infiltrating Tregs and activated conventional T cells. For example, CTLA-4 and PD-1 are both expressed by Tregs and $CD8^+$ CTLs in tumor tissues. We have previously shown that high-ADCC/ADCP anti-CTLA-4 mAb treatment effectively evoked anti-tumor immune responses in tumor-bearing mice only when mAb administered first to deplete Tregs and then tumor antigen vaccination several days later to spare activated $CD8^+$ CTLs from cell depletion by the mAb treatment (Ha et al., PNAS 2019). In contrast, anti-PD-1 blocking mAb not only activate PD-1^+ $CD8^+$ CTLs, but also occasionally drive PD-1^+ Tregs to proliferate and enhance their suppressive activity, hindering tumor immunity and even causing rapid cancer progression called hyper-progressive disease (HPD) (Kamada et al., PNAS 2019).

These findings have prompted us to search for a molecule that is more specifically expressed by Tregs but not by activated $CD8^+$ CTLs in tumor tissues, enabling specific depletion of tumor Tregs but not activated $CD8^+$ CTLs. In 2022, assuming that tumor Tregs would clonally expand when they were activated by tumor-associated antigens to suppress anti-tumor immune responses, we performed single-cell analysis on tumor Tregs to characterize them by T-cell receptor (TCR) clonotype and gene expression profiles. We found that multi-clonal Tregs present in tumor tissues predominantly expressed the chemokine receptor CCR8. In mice and humans, $CCR8^+$ Tregs constituted 30-80% of tumor Tregs in various cancers and less than 10% of Tregs in other tissues, whereas most tumor-infiltrating conventional T cells (Tconvs) were $CCR8^-$. $CCR8^+$ tumor Tregs were highly differentiated, functionally stable, and potently suppressive. One-time administration of cell-depleting anti-CCR8 mAb indeed selectively eliminated multi-clonal tumor Tregs, leading to cure of established tumors in mice. The treatment resulted in the expansion of $CD8^+$ effector Tconvs, including tumor-antigen-specific ones, that were more activated and less exhausted than those induced by anti-PD-1 immune checkpoint blockade. Anti-CCR8 mAb treatment also evoked strong secondary immune responses against the same tumor cell line inoculated several months after tumor eradication, indicating that elimination of tumor-reactive multi- clonal Tregs was sufficient to induce memory-type tumor-specific effector Tconvs. Despite induction of such potent tumor immunity, anti-CCR8 mAb treatment elicited minimal autoimmunity in mice, contrasting with systemic Treg depletion, which eradicated tumors but induced severe autoimmune disease. Thus, specific removal of clonally expanding Tregs in tumor tissues for a limited period by cell-depleting anti-CCR8 mAb treatment can generate potent tumor immunity with long-lasting memory and

without deleterious autoimmunity. Cancer immunotherapy with cell-depleting anti-CCR8 mAb is envisaged in the clinic.

List of Publications

1）原著論文

1. Tay C, Tanaka A, Sakaguchi S. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy. *Cancer Cell.* 2023 Mar 13;41（3）:450-465. doi: 10.1016/j.ccell.2023.02.014. PMID: 36917950.

2. Tanaka A, Maeda S, Nomura T, Llamas-Covarrubias MA, Tanaka S, Jin L, Lim EL, Morikawa H, Kitagawa Y, Akizuki S, Ito Y, Fujimori C, Hirota K, Murase T, Hashimoto M, Higo J, Zamoyska R, Ueda R, Standley DM, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Construction of a T-cell receptor signaling range for spontaneous development of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 2023 Feb 6;220（2）:e20220386. doi: 10.1084/jem.20220386. Epub 2022 Dec 1. PMID: 36454183; PMCID: PMC9718937.

3. Søndergaard JN, Tulyeu J, Edahiro R, Shirai Y, Yamaguchi Y, Murakami T, Morita T, Kato Y, Hirata H, Takeda Y, Okuzaki D, Sakaguchi S, Kumanogoh A, Okada Y, Wing JB. A sex-biased imbalance between Tfr, Tph, and atypical B cells determines antibody responses in COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2023 Jan 24;120（4）:e2217902120. doi: 10.1073/pnas.2217902120. Epub 2023 Jan 20. PMID: 36669118.

4. Minohara K, Imai M, Matoba T, Wing JB, Shime H, Odanaka M, Uraki R, Kawakita D, Toyama T, Takahashi S, Morita A, Murakami S, Ohkura N, Sakaguchi S, Iwasaki S, Yamazaki S. Mature dendritic cells enriched in regulatory molecules may control regulatory T cells and the prognosis of head and neck cancer. *Cancer Sci.* 2022 Dec 18. doi: 10.1111/cas.15698. Epub ahead of print. PMID: 36529525.

5. Arai M, Fukuda A, Morimoto R, Nakamura Y, Ci Z, Sakaguchi S. Protocol to evaluate cell lineage stability of mouse natural and induced regulatory T cells using bisulfite sequencing. *STAR Protoc.* 2022 Sep 17;3（4）:101694. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101694. Epub ahead of print. PMID: 36121747; PMCID: PMC9489535.

6. Yasumizu Y, Ohkura N, Murata H, Kinoshita M, Funaki S, Nojima S, Kido K, Kohara M, Motooka D, Okuzaki D, Suganami S, Takeuchi E, Nakamura Y, Takeshima Y, Arai M, Tada S, Okumura M, Morii E, Shintani Y, Sakaguchi S, Okuno T, Mochizuki H. Myasthenia gravis-specific aberrant neuromuscular gene expression by medullary thymic epithelial cells in thymoma. *Nat Commun.* 2022 Jul 22;13（1）:4230. doi: 10.1038/s41467-022-31951-8. PMID: 35869073; PMCID: PMC9305039.

7. Thumkeo D, Punyawatthananukool S, Prasongtanakij S, Matsuura R, Arima K, Nie H, Yamamoto R, Aoyama N, Hamaguchi H, Sugahara S, Takeda S, Charoensawan V, Tanaka A, Sakaguchi S, Narumiya S. PGE_2-EP2/EP4 signaling elicits immunosuppression by driving the mregDC-Treg axis in inflammatory tumor microenvironment. *Cell Rep.* 2022 Jun 7;39（10）:110914. doi: 10.1016/

j.celrep.2022.110914. PMID: 35675777.

8. Nakano S, Mikami N, Miyawaki M, Yamasaki S, Miyamoto S, Yamada M, Temma T, Nishi Y, Nagaike A, Sakae S, Furusawa T, Kawakami R, Tsuji T, Kohno T, Yoshida Y. Therapeutic Strategy for Rheumatoid Arthritis by Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells with High Suppressive Potential. Biol Pharm Bull. 2022 Aug 1;45（8）:1053-1060.

9. Kidani Y, Nogami W, Yasumizu Y, Kawashima A, Tanaka A, Sonoda Y, Tona Y, Nashiki K, Matsumoto R, Hagiwara M, Osaki M, Dohi K, Kanazawa T, Ueyama A, Yoshikawa M, Yoshida T, Matsumoto M, Hojo K, Shinonome S, Yoshida H, Hirata M, Haruna M, Nakamura Y, Motooka D, Okuzaki D, Sugiyama Y, Kinoshita M, Okuno T, Kato T, Hatano K, Uemura M, Imamura R, Yokoi K, Tanemura A, Shintani Y, Kimura T, Nonomura N, Wada H, Mori M, Doki Y, Ohkura N, Sakaguchi S. CCR8-targeted specific depletion of clonally expanded Treg cells in tumor tissues evokes potent tumor immunity with long-lasting memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Feb 15;119（7）:e2114282119. doi: 10.1073/pnas.2114282119. PMID: 35140181; PMCID: PMC8851483.

10. Goda N, Sasada S, Shigematsu H, Masumoto N, Arihiro K, Nishikawa H, Sakaguchi S, Okada M, Kadoya T. The ratio of CD8＋lymphocytes to tumor-infiltrating suppressive FOXP3＋effector regulatory T cells is associated with treatment response in invasive breast cancer. *Discov Oncol.* 2022 Apr 19;13（1）:27. doi: 10.1007/s12672-022-00482-5. PMID: 35438346; PMCID: PMC9018954.

11. Lee MSJ, Inoue T, Ise W, Matsuo-Dapaah J, Wing JB, Temizoz B, Kobiyama K, Hayashi T, Patil A, Sakaguchi S, Simon AK, Bezbradica JS, Nagatoishi S, Tsumoto K, Inoue JI, Akira S, Kurosaki T, Ishii KJ, Coban C. B cell-intrinsic TBK1 is essential for germinal center formation during infection and vaccination in mice. *J. Exp. Med.* 2022 Feb 7;219（2）:e20211336. doi: 10.1084/jem.20211336. Epub 2021 Dec 15. PMID: 34910106; PMCID: PMC8679780.

12. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, Andrä I, Andreata F, Annunziato F, Arranz E, Bacher P, Bari S, Barnaba V, Barros-Martins J, Baumjohann D, Beccaria CG, Bernardo D, Boardman DA, Borger J, Böttcher C, Brockmann L, Burns M, Busch DH, Cameron G, Cammarata I, Cassotta A, Chang Y, Chirdo FG, Christakou E, Čičin-Šain L, Cook L, Corbett AJ, Cornelis R, Cosmi L, Davey MS, De Biasi S, De Simone G, Del Zotto G, Delacher M, Di Rosa F, Di Santo J, Diefenbach A, Dong J, Dörner T, Dress RJ, Dutertre CA, Eckle SBG, Eede P, Evrard M, Falk CS, Feuerer M, Fillatreau S, Fiz-Lopez A, Follo M, Foulds GA, Fröbel J, Gagliani N, Galletti G, Gangaev A, Garbi N, Garrote JA, Geginat J, Gherardin NA, Gibellini L, Ginhoux F, Godfrey DI, Gruarin P, Haftmann C, Hansmann L, Harpur CM, Hayday AC, Heine G, Hernández DC, Herrmann M, Hoelsken O, Huang Q, Huber S, Huber JE, Huehn J, Hundemer M, Hwang WYK, Iannacone M, Ivison SM, Jäck HM, Jani PK, Keller B, Kessler N, Ketelaars S, Knop L, Knopf J, Koay HF, Kobow K, Kriegsmann K, Kristyanto H, Krueger A, Kuehne JF, Kunze-Schumacher H, Kvistborg P, Kwok I, Latorre D, Lenz D, Levings MK, Lino AC, Liotta F, Long HM, Lugli E, MacDonald KN, Maggi L, Maini MK, Mair F, Manta C, Manz RA,

Mashreghi MF, Mazzoni A, McCluskey J, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Monin L, Moretta L, Multhoff G, Muñoz LE, Muñoz-Ruiz M, Muscate F, Natalini A, Neumann K, Ng LG, Niedobitek A, Niemz J, Almeida LN, Notarbartolo S, Ostendorf L, Pallett LJ, Patel AA, Percin GI, Peruzzi G, Pinti M, Pockley AG, Pracht K, Prinz I, Pujol-Autonell I, Pulvirenti N, Quatrini L, Quinn KM, Radbruch H, Rhys H, Rodrigo MB, Romagnani C, Saggau C, Sakaguchi S, Sallusto F, Sanderink L, Sandrock I, Schauer C, Scheffold A, Scherer HU, Schiemann M, Schildberg FA, Schober K, Schoen J, Schuh W, Schüler T, Schulz AR, Schulz S, Schulze J, Simonetti S, Singh J, Sitnik KM, Stark R, Starossom S, Stehle C, Szelinski F, Tan L, Tarnok A, Tornack J, Tree TIM, van Beek JJP, van de Veen W, van Gisbergen K, Vasco C, Verheyden NA, von Borstel A, Ward-Hartstonge KA, Warnatz K, Waskow C, Wiedemann A, Wilharm A, Wing J, Wirz O, Wittner J, Yang JHM, Yang J. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol.* 2021 Dec;51 (12):2708-3145. doi: 10.1002/eji.202170126. Epub 2021 Dec 7. PMID: 34910301.

13. Wing JB, Sakaguchi S. Using Mass Cytometry to Address Tfh and Tfr Heterogeneity. *Methods Mol Biol.* 2022;2380:47-57. doi: 10.1007/978-1-0716-1736-6_5. PMID: 34802121.

2）総説

坂口志文：ヒト制御性 T 細胞：自己免疫病を中心に　実験医学　Vol.40 No.1 41-46, 2022.

川上竜司：Non － Coding DNA 領域による制御性 T 細胞分化メカニズム　医学のあゆみ 280 巻 13 号 , 1326-1327, 2022.

川上竜司：胸腺における制御性 T 細胞分化に不可欠な非コードエンハンサー領域　臨床免疫・アレルギー科 77-3, 346-351, 2022.

木谷友次朗、坂口志文：がん免疫ネットワークへの制御性 T 細胞の影響およびその治療応用　医学のあゆみ　Vol.281 No.5 395-400, 2022.

坂口志文：がん免疫療法の展望―免疫制御機構に関する最近の知見をもとに　医学のあゆみ　Vol.281 No.5 573-576, 2022.

坂口志文：末梢性免疫自己寛容と自己免疫疾患　実験医学　Vol.40 No.15 2416-2419, 2022.

学会等の講演

1）学会・研究会発表

安水良明：Bioinformatics で遺伝要因から環境要因まで　第 63 回日本神経学会学術大会（2022.5.18-21. 東京）

荒井真也、川上竜司、三上統久、中村やまみ、坂口志文：抗原特異的に発生した末梢由来制御性 T 細胞は Treg 特異的エピゲノムを獲得し、経口免疫寛容を成立させる　第 45 回日本分子生物学会年会（2022.11.30-12.2. 千葉）

Motonao Osaki, Tekguc Murat, Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells convert antigen presenting cells towards a tolerogenic state via CTLA-4-dependent trogocytosis of CD80. 第 45 回日本分子生物学会年会（2022.11.30-12.2. 千葉）

Ryoji Kawakami, Shimon Sakaguchi: Isolation of thymic self-reactive T cells with differentiation preference for regulatory T cells. 第 51 回日本免疫学会学術集会（2022 年 12 月 . 熊本）

Ryoji Kawakami, Shimon Sakaguchi: Coordinated activation of evolutionary-conserved enhancer elements for thymic Treg cell generation. DGfI Spring School on Immunology（Ettal, Bavaria, Germany 2023 年 3 月）

2）講演・シンポジウム

Shimon Sakaguchi: Targeting regulatory T cells for cancer immunity. 第 5 回 国際がん研究シンポジウム（2022.1.15. 大阪／ Web meeting）国内

坂口志文：制御性 T 細胞による新しい免疫医療　第 86 回日本循環器学会学術集会（2022.3.11. 神戸／ 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 20 回神経筋の免疫疾患を考える会（2022.4.20. 大阪）国内

Shimon Sakaguchi: Induction of tumor immunity with long-lasting memory by depleting clonally expanding Tregs in tumor tissues. UCL-IFReC Joint international Symposium（2022.5.13. London, UK）

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫疾患の治療：抗原特異的免疫抑制をめざして　金沢大学十全医学会総会・学術集会（2022.6.14. 金沢）国内

Shimon Sakaguchi: Developing therapies to target immune regulation: towards antigen-specific immunosuppression. 5th Newcastle International Therapeutic Tolerance Workshop（2022.6.28-7.1. Newcastle, UK）

Shimon Sakaguchi: Control of antigen-presenting cells by regulatory T cells to induce immune tolerance. the Joint Meeting Annual of the German Society of Immunology（DGfI）and the Austrian Society for Allergology & Immunology（ÖGAI）2022（2022.9.7-10. Hannover, Germany）

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by Tregs: towards antigen-specific Treg cell therapy. The promise of Interleukine-2 Therapy（2022.9.14-17. Paris, France）

坂口志文：腫瘍組織の免疫モニタリングの新手法―臨床治験への応用―　第 81 回日本癌学会学術

総会（2022.9.29. 横浜）国内

坂口志文：新しい免疫医療に向けて　第 72 回日本薬学会関西支部総会・大会（2022.10.8. 大阪）国内

Shimon Sakaguchi: Developing therapies to target immune regulation: towards antigen-specific immunosuppression. 第 6 回ヒト化マウス国際ワークショップ（IWHM6）（2022.10.12-14. 京都／Web meeting）国内

Shimon Sakaguchi: Regulatory T Cells. 20th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies（ESID）（2022.10.12-15. Gothenburg, Sweden）国外

Ryoji Kawakami: Coordinated activation of enhancer elements for thymic Treg development and immunological self-tolerance. The 17th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences（2022 年 10 月 . 金沢）

坂口志文：制御性 T 細胞の発見とがん免疫治療への展開　第 60 回日本癌治療学会学術集会（2022.10.20-22. 神戸）国内

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by Treg cells: roles of membrane and soluble forms of Treg-expressed CTLA-4.　The 1st International School on Advanced Immunology（2022.11.7-10. Awaji, Hyogo）

Shimon Sakaguchi: Developing therapies to target immune regulation: towards antigen-specific immunosuppression. 第 51 回日本免疫学会学術集会（2022.12.7-9. 熊本）国内

Ryoji Kawakami: Elementary instruction of early T cells for the diverse modalities of regulatory T cell generation. Onsite Seminar at Max-Planek Institut fuer Immmunbiologie und Epigenetik（2023. 2.22. Freiburg, Germany）

Ryoji Kawakami: Elementary instruction of early T cells for the diverse modalities regulatory T cell generation. TRR 355 Seminar Series at Johannes Gutenberg-Universität Mainz（2023. Mainz, Germany）

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

バイオメカニクス分野
Laboratory of Biomechanics

教　授	安達　泰治	Prof.	Taiji Adachi
講　師	オケヨ　ケネディ	Sr. Lect.	Okeyo Kennedy Omondi
助　教	亀尾　佳貴	Assist. Prof.	Yoshitaka Kameo
助　教	牧　功一郎	Assist. Prof.	Koichiro Maki

本分野では、生物の形態形成、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。特に、分子・細胞レベルから組織・器官レベルにおいて創発される生命システムのダイナミクスを理解するため、実験と計算科学を組み合わせたバイオメカニクス・メカノバイオロジー研究を進めている。2022 年度においては、骨基質中に存在する骨細胞に対する間質液流れを解析するための *in silico* 計算フレームワークを構築した。また、骨細胞・軟骨細胞を用いたスフェロイド培養による初期軟骨骨化モデルの *in vitro* 構築を進めた。

1）骨細胞に対する流れ誘起ひずみ解析のための計算フレームワークの構築

骨基質中に存在する骨細胞は、骨小腔－骨細管系内の間質液の流れに応答して骨リモデリングを制御する主要なメカノセンサー細胞であると考えられている。骨細胞によるメカノセンシング機構を理解するためには、間質液の流れにより骨細胞突起の細胞膜に生じる局所的なひずみを評価することが重要である。細胞周囲マトリックス（PCM）や骨細管の超微細構造など、骨細胞を取り巻く微小環境は、細胞周囲に間質液の不均質な流動パターンを作り出すため、流れによる骨細胞突起膜ひずみに大きな影響を及ぼす重要な因子である。そこで本研究では、骨細胞の微小環境の変化がこの流れ誘起ひずみに及ぼす影響を調べるため、流体と構造との相互作用を解析可能な新しい計算フレームワークを開発した。提案したフレームワークに基づく計算機シミュレーションにより、PCM 密度や骨細管曲率の変化に応じた骨細胞突起膜の流れ誘起ひずみの空間分布を評価することが可能となった。シミュレーションの結果、加齢や骨疾患にともなう PCM 密度の低下や骨細管曲率の増加は、骨細胞突起膜の局所的な流れ誘起ひずみを顕著に増大させる効果を持つことが明らかになった（Fig.1）。本研究で提案した計算フレームワークは、生体内の個別の骨細胞に対する力学刺激の解析を可能とするものであり、生きた骨組織内部における骨細胞の微視的な力学環境を明らかにすることを通じ、骨細胞のメカノバイオロジー研究の発展に貢献すると期待される。

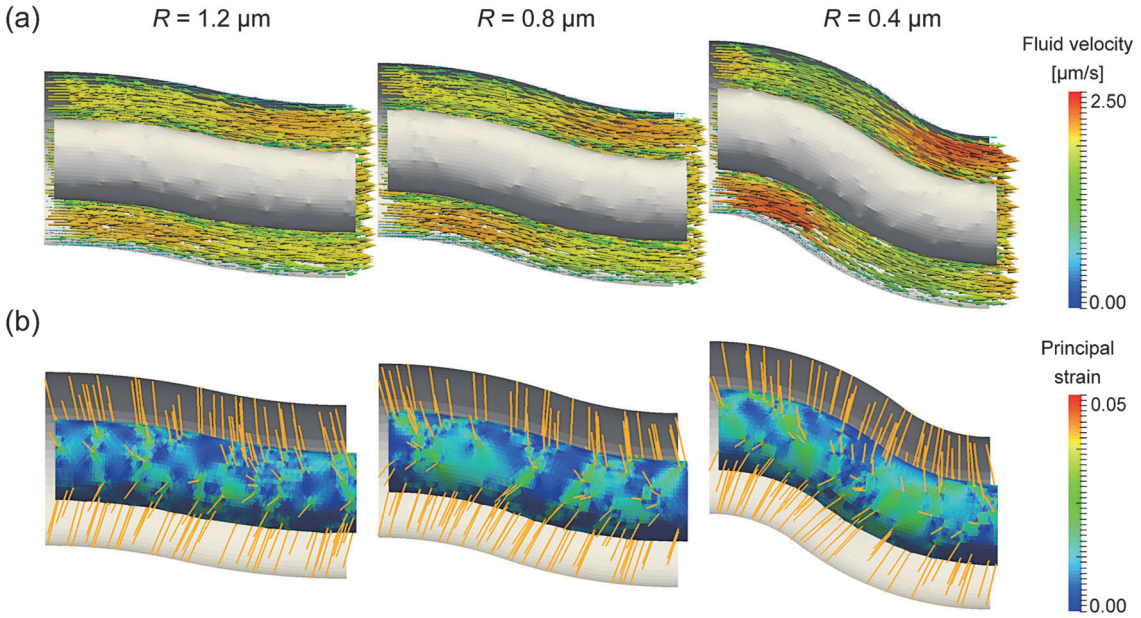


Fig. 1. Fluid–structure interaction simulation to evaluate flow-induced strain on the osteocyte process membrane. Effects of an increase in canalicular curvature, which is represented by a decrease in its curvature radius *R*, on（a）the fluid velocity in the canaliculus and（b）the flow-induced principal strain on the osteocyte process membrane were investigated（Kameo *et al.*, 2022）.

1）Computational framework for analyzing flow-induced strain on osteocyte as modulated by microenvironment

Osteocytes buried in bone matrix are major mechanosensory cells that regulate bone remodeling in response to interstitial fluid flow in a lacuno-canalicular porosity. To gain an understanding of the mechanism of osteocyte mechanosensing, it is important to be able to evaluate the local strain on the osteocyte process membrane induced by the interstitial fluid flow. The microenvironment of the osteocytes, including the pericellular matrix（PCM）and canalicular ultrastructure, is a key modulator of the flow-induced strain on the osteocyte process membrane because it produces heterogeneous flow patterns in the pericellular space. To investigate the effect of changes in the microenvironment of osteocytes on the flow-induced strain, we developed a novel computational framework for analyzing the fluid–structure interaction. Computer simulations based on the proposed framework enabled evaluation of the spatial distribution of flow-induced strain on the osteocyte process membrane according to changes in the PCM density and canalicular curvature. The simulation results reveal that a decrease in PCM density and an increase in canalicular curvature, each of which is associated with aging and bone disease, have the notable effect of enhancing local flow-induced strain on the osteocyte process membrane. We believe that the proposed computational framework is a promising framework for investigating cell-specific mechanical stimuli and that it has the potential to accelerate the mechanobiological study of osteocytes by providing a deeper understanding of their mechanical environment in living bone tissue.

2）軟骨細胞のスフェロイド培養による初期軟骨内骨化誘導

軟骨内骨化は、骨の発生段階において、軟骨から骨が形成されるプロセスである。我々の先行研究では、3 次元培養下において、骨芽細胞前駆細胞の骨細胞分化を誘導した。本研究では、軟骨内骨化を試験管内で再現するために、軟骨前駆細胞によって自己組織化されるスキャフォールドフリーなスフェロイドモデルを作製した。化学的な軟骨分化誘導を行わない状態で 2 日間培養したところ、軟骨細胞マーカーの発現が、スフェロイドの内部領域のみで確認された。一方、肥大軟骨細胞マーカーの発現は、スフェロイドの表面領域で強く検出された。特に、骨細胞マーカーの遺伝子発現レベルも、従来の 2 次元単層培養に比べてスフェロイド内では大幅に上昇することが示された。さらに、28 日間の長期スフェロイド培養後、軟骨内骨化の初期段階である細胞肥大化や細胞死などの形態変化が確認された。以上のように、本研究では、初期軟骨内骨化の再現を目指して、3 次元培養による軟骨前駆細胞の肥大軟骨細胞分化への誘導可能性を示唆する結果が得られた。

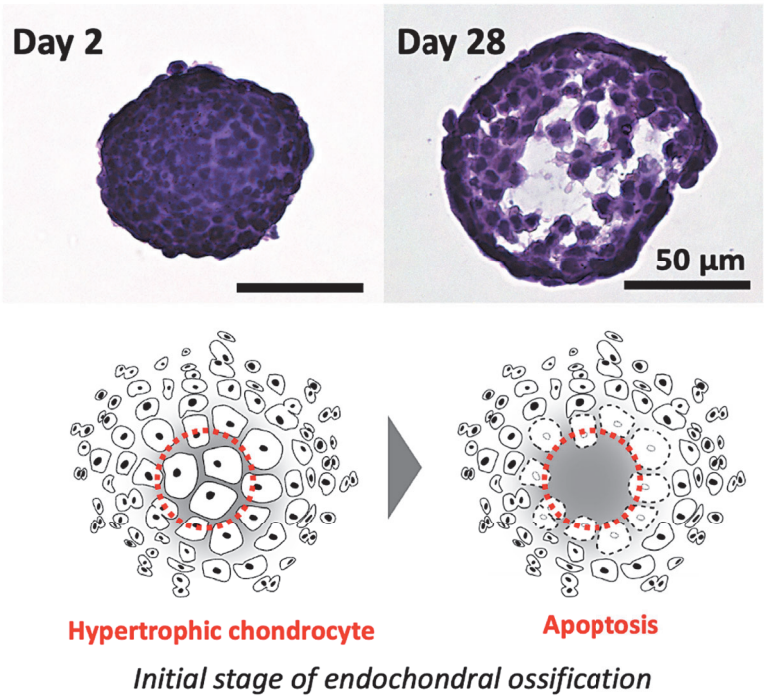


Fig. 2. We fabricated scaffold-free spheroids using mouse pre-chondrocyte ATDC5 cells. The long-term spheroid culture for 28 days induced hypertrophic chondrocyte differentiation and apoptosis, which is an initial stage of the endochondral ossification（Kim *et al.*, 2022）.

2）Spheroid Culture for Chondrocytes Triggers the Initial Stage of Endochondral Ossification

Endochondral ossification is the process of bone formation derived from growing cartilage during skeletal development. In previous studies, we provoked the osteocyte differentiation of osteoblast precursor cells under a three-dimensional（3D）culture model. To recapitulate the endochondral ossification, the present study utilized the self-organized scaffold-free spheroid model reconstructed by pre-chondrocyte cells. Within

2-day cultivation in the absence of the chemically induced chondrogenesis supplements, the chondrocyte marker was greatly expressed in the inner region of the spheroid, whereas the hypertrophic chondrocyte marker was strongly detected in the surface region of the spheroid. Notably, we found out that the gene expression levels of osteocyte markers were also greatly upregulated compared to the conventional 2D monolayer. Moreover, after long-term cultivation for 28 days, it induced morphological changes in the spheroid, such as cellular hypertrophy and death. In this study, in order to recapitulate the initial stage of the endochondral ossification, we highlighted the potentials of the 3D culture method to drive the hypertrophic chondrocyte differentiation of the pre-chondrocyte cells.

List of Publications

1. 論文

Kanda, E., Epureanu B. I., Adachi, T., Kashihara, N.（2023）. Machine-learning-based Web System for the Prediction of Chronic Kidney Disease Progression and Mortality. **PLOS Digital Health**, *Vol. 2*, No. 1, #e0000188.

Kawai, S., Sunaga, J., Nagata, S., Nishio, M., Fukuda, M., Kamakura, T., Sun, L., Jin, Y., Sakamoto, S., Watanabe, A., Matsuda, S., Adachi, T., Toguchida, J.（2023）. 3D Osteogenic Differentiation of Human iPSCs Reveals the Role of TGFβ Signal in the Transition from Progenitors to Osteoblasts and Osteoblasts to Osteocytes. **Scientific Reports**, *Vol. 13*, #1094.

Kim, J., Tomida, K., Matsumoto, T., Adachi, T.（2022）. Spheroid Culture for Chondrocytes Triggers the Initial Stage of Endochondral Ossification. **Biotechnology and Bioengineering**. *Vol. 119*, No. 11, pp. 3311-3318.

Song, X., Adachi, T., Kimura, T., Saito, N.（2022）. Wolverine Cutting Balloon in the Treatment of Stent Underexpansion in Heavy Coronary Calcification: Bench Test Using a Three-Dimensional Printer and Computer Simulation with the Finite Element Method. **Cardiovascular Intervention and Therapeutics**, *Vol. 37*, No. 3, pp. 506-512.

Nakao, N., Adachi, T.（2022）. Investigation of Mechanosensing and Mechanoresponse Mechanisms in Osteoblasts and Osteocytes: In vitro Experiments Targetting Subcellular Components. **Journal of Mechanical Science and Engineering**, Vol. 17, No. 4, #22-00267.

Kim, J., Inagaki, T., Sunaga, J., Adachi, T., Matsumoto, T.（2022）. Effect of Chemically Induced Osteogenesis Supplements on Multicellular Behavior of Osteocytic Spheroids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 622, pp. 79-85.

Ichijo, R., Maki, K., Kabata, M., Murata, T., Nagasaka, A., Ishihara, S., Haga, H., Honda, T., Adachi, T., Yamamoto, T., Toyoshima, F.（2022）. Vasculature Atrophy Causes a Stiffened Microenvironment that Augments Epidermal Stem Cell Differentiation in Aged Skin. **Nature Aging**, Vol. 2, pp. 592-600.

Song, X., Adachi, T., Kimura, T., Saito, N.（2022）. Wolverine Cutting Balloon in the Treatment of Stent Underexpansion in Heavy Coronary Calcification: Bench Test Using a Three-Dimensional Printer and Computer Simulation with the Finite Element Method. **Cardiovascular Intervention and Therapeutic**s, Vol. 37, No. 3, pp. 506-512.

Kameo, Y., Ozasa, M., Adachi, T.（2022）. Computational Framework for Analyzing Flow-induced Strain on Osteocyte as Modulated by Microenvironment. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Material**s, Vol. 126, 105027.

Ando, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T.（2022）. Pluripotency State of Mouse ES Cells Determines their Contribution to Self-organized Layer Formation by Mesh Closure on Microstructured Adhesion-limiting Substrates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 590, pp. 97-102.

Song, X., Adachi, T., Kawase, Y., Kimura, T., Saito, N.（2022）. Efficacy of the Wolverine Cutting Balloon on a Circumferential Calcified Coronary Lesion: Bench Test Using a Three-dimensional Printer and Computer Simulation with the Finite Element Method. **Cardiovascular Intervention and Therapeutics**, *Vol. 37*, No. 1, pp. 78-88.

2. 書籍・総説等

安達泰治、冨田佳宏（2022.9）. 連続体力学の基礎（第 2 版）、204 pages、養賢堂

亀尾佳貴、安達泰治（2023.1）. “骨代謝･リモデリングにおける多階層数理バイオメカニクス”、日本臨牀 増刊号 最新の骨粗鬆症学（第 2 版）（第 II 章 1 節 6 項）、pp. 76-82、日本臨牀社

List of Presentations

1. 講演・シンポジウム

Adachi, T., Roles of mechanosensory osteocytes in bone adaptation by remodeling: in vitro and in silico studies. <Invited> International Symposium on Mechanobiology for Human Health: 8 years progress in the BMED-CREST/PRIME project on mechanobiology, Tokyo, March 22-23, 2023.

Adachi, T., Mathematical Modeling and Computer Simulation of Tissue Morphogenesis Regulated by Multicellular Mechanics. <Invited> International Symposium on Neural Development and Diseases, Kyoto, March 15-17, 2023.

Adachi, T. Yokoyama, Y., Kamioka, H., Kameo, Y. Image-based Simulation Study on Mechanosensing Amplification Mechanism at Osteocyte Processes in Bone Canalicular Space. <Mini Symposium> 15th World Congress on Computational Mechanics and 8th Asian Pacific Congress on Computational Mechanics（WCCM-APCOM2022）, MS0403: Molecular and Cellular Biomechanics, p. 712, Yokohama, Online, July 31-August 5, 2022.

Maki, K., Fukute, J., Suetake, T., Adachi, T. A Novel Fluorescent Technique for Single-stranded DNA in Cell Nucleus: Toward Understanding Biomechanical Behaviors of Genomic DNA. <Invited> 9th World Congress of Biomechanics（WCB 2022）, O-22086: The Search for the Next Critical Tool in Cellular Mechanosensing: A Special Session Honoring Christopher Jacobs, Taipei, Taiwan, Online, July 10-14, 2022.

Yokoyama, Y., Kameo, Y., Adachi, T. Mechanical Modeling of Multicellular Growth for Computer Simulation of Bone Morphogenesis. <Invited> 9th World Congress of Biomechanics（WCB 2022）, O-22098: Multicellular Mechanics in Development and Homeostasis, Taipei, Taiwan, Online, July 10-14, 2022.

Kim, Y.K., Kameo, Y., Tanaka, S., Adachi, T. Modeling and Simulation of Bone Turnover in Age-related Osteoporosis Considering Bone Cell Population. <Invited> 9th World Congress of Biomechanics（WCB 2022）, O-02092: Computational Methods in Cell Mechanics 2（Physical/Structural Aspects）, Taipei, Taiwan, Online, July 10-14, 2022.

Adachi, T. In Silico Experiments of Bone Adaptation by Remodeling for Exploring Diseases and Drug Treatment. <Keynote>, IUPESM World Congress on Medical Physics & Biomedical Engineering（IUPESM WC202）, Singapore, Online, June 12-17.

Adachi, T. Multiscale Modeling and in Silico Experiments of Bone Mechanical Adaptation by Remodeling. <Invited> Symposium 5: Unveiling Morphogenesis through Theory and Engineering, 55th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Kanazawa, May 31-July 3.

安達泰治　骨の形態適応におけるメカノセンサー骨細胞の役割：in vitro/in silico 実験 . < 特別講演 > 日本バイオマテリアル学会第 10 回中四国ブロックシンポジウム：階層設計とバイオマテリアル、高松、2023 年 2 月 8 日

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　力学状態に応じた細胞増殖による組織形態形成の数理解析 . <Invited>　日本機械学会 第 33 回バイオフロンティア講演会、#2F01、神戸、2022 年 12 月 17-18 日

安達泰治、横山優花、鈴木龍之介、亀尾佳貴　骨の形づくりとリモデリングの力学的理解を目指した数理モデリング .　<Workshop>　第 45 回日本分子生物学会年会、WS: 運動器科学の最前線、#1PW-12-3、幕張、2022 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

安達泰治、横山優花、須長純子、牧功一郎、亀尾佳貴　メカノセンサー骨細胞の in vitro/in silico バイオメカニクス実験 . <Symposium> 第 49 回日本臨床バイオメカニクス学会、シンポジウム 7：マルチスケールバイオメカニクス－ナノ・ミクロメカニクスから組織再生－、#S7-1、弘前、2022 年 11 月 4-5 日

安達泰治　メカノセンサー骨細胞ネットワークの役割 . <Symposium> 第 23 回生命科学研究科シンポジウム、京都、2021 年 7 月 7-8 日

亀尾佳貴　小脳形態成における多細胞ダイナミクスの力学的役割 . <Symposium> 日本機械学会第 34 回バイオエンジニアリング講演会、1B23、福岡、2022 年 6 月 25-26 日

2. 研究会・セミナー等

福手淳平、牧功一郎、安達泰治　Underwound DNA が発生する力学的メカニズムの解明. CREST「多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出」第 4 回領域会議、名古屋、2023 年 1 月 11-13 日

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　細胞増殖の粒子モデルによる多細胞組織の形態形成解析. CREST「多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出」第 4 回領域会議、名古屋、2023 年 1 月 11-13 日

吉本昴希、牧功一郎、安達泰治、亀井謙一郎　周期的力学刺激が促進する肝芽形成時の上皮間葉転換. CREST「多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出」第 4 回領域会議、名古屋、2023 年 1 月 11-13 日

Fukute, J. DNA underwinding mechanisms explored by in situ visualization of underwound DNA. 大学院教育支援機構奨励研究員及びフェローシップ受給者によるポスター発表会・研究交流会、京都、2022 年 10 月 21-27 日

Yokoyama, Y. Mechanical Analysis of Cellular Activities in Bone Morphogenesis and Remodeling, Open Seminar, Kanazawa, September, 8, 2022.

金英寛、田中栄、安達泰治　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.「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」2021 年度共同研究合同報告会、京都 Online、2022 年 3 月 16 日

牧功一郎　Principles of chromatin nanomechanical dynamics and its role in transcription and stem cell identity.「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」2021 年度共同研究合同報告会、京都 Online、2022 年 3 月 16 日

金英寛、田中栄、安達泰治　骨代謝治療効果の in silico 分析統合基盤による薬剤新規効果の探究.「ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点」2022 年度キックオフミーティング、京都 Online、2022 年 3 月 11 日

福手淳平　超らせんを介したエンハンサー・プロモーターの近接化のメカニズムの解明. CREST「多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出」第 3 回領域会議、Online、2022 年 1 月 17-18 日

3. 学会講演

Yokoyama, Y., Kameo, Y., Adachi, T. Computational Analysis of Tissue Mechanical Behaviors According to

Cell Proliferation during Morphogenesis., RIKEN BDR Symposium 2023, #P-53, Kobe <Poster> March 7-9, 2023.

Kim, J., Adachi, T., Matsumoto, T., Chemical osteogenesis supplements modulated the multicellular behaviors of osteocytic spheroids. 第 22 回日本再生医療学会総会、＃ O-13-4、京都、2023 年 3 月 23-25 日

竹本祐也、牧功一郎、安達泰治　AFM を用いた骨細胞核内のナノ構造イメージング　日本機械学会第 33 回バイオフロンティア講演会、#1E02、神戸、2022 年 12 月 17-18 日

澤田剛、亀尾佳貴、中澤直高、見學美根子、安達泰治　微小間隙における神経細胞遊走の数理モデル構築　日本機械学会第 33 回バイオフロンティア講演会、#1E09、神戸、2022 年 12 月 17-18 日

福手淳平、牧功一郎、安達泰治　核内構造体における underwound DNA の空間分布の解析　日本機械学会第 33 回バイオフロンティア講演会、#2E09、神戸、2022 年 12 月 17-18 日

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　力学状態に応じた細胞増殖による組織形態形成の数理解析　日本機械学会第 33 回バイオフロンティア講演会、#2F01、神戸、2022 年 12 月 17-18 日

鈴木龍之介、亀尾佳貴、安達泰治　海綿骨の格子弾性体モデルの構築　日本機械学会第 33 回バイオフロンティア講演会、#2F02、神戸、2022 年 12 月 17-18 日

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　細胞の肥大と増殖の粒子モデリングによる骨組織形態形成の連続体力学解析　日本機械学会第 35 回計算力学講演会（CMD2022）、OS-06: メッシュフリー／粒子法とその関連技術、#6-05、鹿児島 Online、2022 年 11 月 16-18 日

Kim, J., Tomida, K., Maeda, E., Adachi, T., Matsumoto, T., In vitro Spheroid Culture for Chondrogenic Precursor ATDC5 Cells Provokes an Initial Stage of Endochondral Ossification. The 4th International Symposium on Mechanobiolog y（ISMB2022）, #FO-007, Sydney, Australia <Poster> November 6-9, 2022.

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　骨形態形成過程における細胞動態の力学モデリングとシミュレーション　第 49 回日本臨床バイオメカニクス学会学術集会、#O28-7、弘前、2022 年 11 月 4-5 日

Fukute, J., Unveiling DNA twisting mechanisms by fluorescence imaging of underwound DNA in the cell nucleus. The 28th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, #S4-4, Shanghai, Online October 26-28, 2022.

Kim, J., Adachi, T., Matsumoto, T., Induction of Osteocyte Differentiation for Mesenchymal Stem Cells in 3D Scaffold-free Spheroid Culture., TERMIS-AP 2022, Session: S10-F_Organoid for Tissue Engineering, #S10-F-03, Jeju, Korea, October 5-8, 2022.

Kanda, E., Bogdan I. Epureanu., Adachi, T., Kashihara, N., New Surrogate Marker of Chronic Kidney Disease Progression and Mortality in Medical-Word Virtual Space: Prospective Cohort Study., 2022

SIAM Conference on Mathematica of Data Science（MDS22）, San Diego, Hybrid, September 26-30, 2022.

Maki, K., Fukute, J., Adachi, T., Single-stranded DNA Forms Condensates Surrounding Nucleoli., 第 60 回日本生物物理学会年会 , #2Pos112, 函館 , September 28-30, 2022.

Fukute, J., Maki, K., Adachi, T., Fluorescence imaging of underwound DNA in the cell nucleus., 第 60 回日本生物物理学会年会 , #2SBA-4, #2Pos116, 函館 , September 28-30, 2022.

亀尾佳貴、山口嵩洋、安達泰治　有限成長理論に基づく神経線維張力に依存した小脳しわ形成の力学的検討 Mechanical Analysis of Axonal Tension-dependent Cerebellar Folding Based on the Theory of Finite Growth　日本機械学会 M&M2022 材料力学カンファレンス、#OS1103、弘前、2022 年 9 月 26-28 日

増山諒、横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　組織形態形成における細胞増殖の連続体ベース粒子モデリング Continuum-based particle modeling of cell proliferation in tissue morphogenesis　日本機械学会 M&M2022 材料力学カンファレンス、#OS1117、弘前、2022 年 9 月 26-28 日

Kim, J., Adachi, T., Matsumoto, T., Generation of Tight Actin Filaments in Response to Osteogenesis Supplements Modulated the Mechanical Behaviors of Osteocytic Spheroids. 日本機械学会 2022 年度年次大会 , No. 22-1, #S021-08, 富山 , September 2-4, 2022.

金英寛、亀尾佳貴、田中栄、安達泰治　デノスマブ中止後に骨量低下をきたす機構の数理シミュレーション解析　第 24 回日本骨粗鬆症学会、一般演題（poster）、#P8-17、大阪、2022 年 9 月 2-4 日

Adachi, T., Yokoyama, Y, Kamioka, H., Kameo, Y., Image-based Simulation Study on Mechanosensing Amplification Mechanism at Osteocyte Processes in Bone Canalicular Space. 15th World Congress on Computational Mechanics（WCCM-XV）, 8th Asian Pacific Congress on Computational Mechanics（APCOM-VIII）, p. 712, Yokoyama, Online, July 31-August 5, 2022.

山家新勢、余昕怡、吉本由紀、樋口真之輔、秋山治彦、安達泰治、宿南知佐　線維軟骨性エンテーシスの形成・維持に寄与する細胞群の特性解析　第 40 回日本骨代謝学会学術集会、#O3-1、岐阜、2022 年 7 月 22-23 日

Kim, J., Inagaki, T, Adachi, T., Matsumoto, T., Modulation of Mechanical Environment to Induce Osteocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. 9th World Congress of Biomechanics, #O-02088, Session: Nuclear Biomechanics 2, Taipei, Online, July 10-14, 2022.

Yoshimoto, K., Maki, K., Adachi, T., Kamei, K., Cyclic Mechanical Strain of Foregut Endoderm Cells Promotes Hepatic Differentiation. 9th World Congress of Biomechanics, #O-03134, Session: Embryonic and Developmental Mechanobiology, Taipei, Online, July 10-14, 2022.

Okeyo, K. O., Kawasaki, T., Kibe, Y., Adachi, T., Collective Cell Alignment in Self-organized Cell Sheets

Induced by Tuning the Mesh Shape of Adhesion-limiting Micromesh Scaffolds. 9th World Congress of Biomechanics, #O-04015, Session: Biomaterials and Biomechanics, Taipei, Online, July 10-14, 2022.

Adachi, T., Fujimoto, K., Kameo, Y., In Silico Modeling of Bone Microdamage Accumulation and Repair by Targeted Remodeling. 9th World Congress of Biomechanics, #O-10016, Session: Bone Mechanics 1, Taipei, Online, July 10-14, 2022.

Kameo, Y., Sakano, N., Adachi, T., Mathematical Model of Bone Remodeling to Capture the Essential Features of Cortical to Cancellous Bone Transformation. 9th World Congress of Biomechanics, #O-12027, Session: Computational Bone Mechanics 2, Taipei, Online, July 10-14, 2022.

Fukute, J., Maki, K., Adachi, T., RNA polymerase II activities promoted by DNA twisting. 9th World Congress of Biomechanics, #O-01045, Session: Molecular Mechanisms of Mechanotransduction, Taipei, Online, July 10-14, 2022.

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　細胞増殖数理モデルによる組織成長の力学解析　日本機械学会第 34 回バイオエンジニアリング講演会、poster #1P2-02、福岡、2022 年 6 月 25-26 日

花谷一圭、亀尾佳貴、安達泰治　小脳形態形成における脳回分岐のシミュレーション解析　日本機械学会第 34 回バイオエンジニアリング講演会、poster #1P2-12、福岡、2022 年 6 月 25-26 日

武藤剛嗣、亀尾佳貴、安達泰治　骨損傷が骨構造リモデリングに及ぼす影響の in silico 解析　日本機械学会第 34 回バイオエンジニアリング講演会、oster #1P2-13、福岡、2022 年 6 月 25-26 日

杉本浩太郎、牧功一郎、須長純子、中島友紀、安達泰治　三次元骨細胞ネットワークにおける力学刺激応答の細胞間伝播特性　日本機械学会第34回バイオエンジニアリング講演会、poster #2P1-15、福岡、2022 年 6 月 25-26 日

キム ジョンヒョン、安達泰治、松本健郎　骨細胞スフェロイドの機械的挙動に対する骨分化誘導剤の影響第 45 回日本バイオレオロジー学会年会、#OS4-5、平塚、2022 年 6 月 4-5 日

Okeyo, K. O., Tamai, r., Adachi, T. A Triculture Model of the Blood-Brain Barrier for Assessing the Effect of Cell-Cell Interactions on Barrier Integrity. The 17th IEEE International Conference on Nano-Micro Engineering & Molecular Systems（IEEE-NEMS2022）, Online, April 14-17, 2022.

Kameo, Y., Takeda, H., Adachi, T., Mechanical Modeling of Brain Morphogenesis Caused by Multicellular Dynamics. International Symposium on Development and Plasticity of Neural System, 京都 , Online, March 14-17, 2022.

山口大輝、須長純子、牧功一郎、中島友紀、安達泰治　細胞間結合に着目した in vitro 骨細胞ネットワーク形成の解析　日本機械学会第 32 回バイオフロンティア講演会、#1A30、名古屋 Online、2022 年 1 月 12-13 日

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治　骨形態形成における細胞動態を考慮した組織成長の数理モデリング　日本機械学会第 32 回バイオフロンティア講演会、No. 21-103、#1B25、名古屋 Online、2022

年 1 月 12-13 日

福田晃子、亀尾佳貴、安達泰治　力学刺激と生体因子の相互作用による腱・靭帯付着部形成の数理モデル構築　日本機械学会第 32 回バイオフロンティア講演会、No. 21-103、#1B34、名古屋 Online、2022 年 1 月 12-13 日

河﨑貴哉、木部善清、オケヨ・ケネディ、安達泰治　剛性異方性基板を用いた細胞シートの配向性誘導　日本機械学会第 32 回バイオフロンティア講演会、No. 21-103、#2A23、名古屋 Online、2022 年 1 月 12-13 日

山口嵩洋、竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治　神経線維の配向に依存した小脳の平行なしわ形成過程の力学的検討　日本機械学会第 32 回バイオフロンティア講演会、No. 21-103、#2B11、名古屋 Online、2022 年 1 月 12-13 日

藤本航成、亀尾佳貴、安達泰治　損傷発展にともなう海綿骨の構造・荷重支持機能変化のシミュレーション解析　日本機械学会第 32 回バイオフロンティア講演会、No. 21-103、#2D19、名古屋 Online、2022 年 1 月 12-13 日

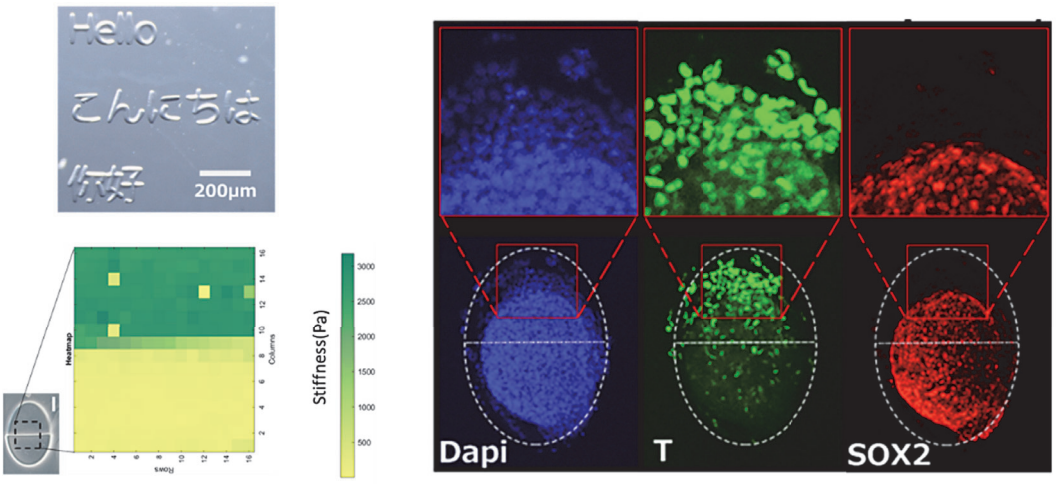
生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

発生システム制御分野
Laboratory of Developmental Systems

教　授	永樂　元次	Prof.	Mototsugu Eiraku
准教授	大串　雅俊	Assoc. Prof.	Masatoshi Ohgushi
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 vitro 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器官形態形成を制御す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、ヒト多能性幹細胞の初期発生を再現するのに適した高分子材料を開発し、それを用いた局所的な分化制御技術について研究を行なった。

試験管内で複雑な組織や臓器を作成するには、細胞外環境の制御が必要である。器官形成過程において、細胞外環境は一様ではなく、その化学的・力学的環境が複雑に変化する。しかし、現行の幹細胞分化系はプラスチック製の硬い培養器具を多く使用しており、実際の体内環境を正確に再現することができない。これらの問題を克服するために、私たちは幹細胞培養に適した新規光硬化性高分子材料の開発に取り組んだ。その結果、生体適合性があり、光により硬さや構造をミクロン単位で精密に制御することが可能な新規ハイドロゲルの開発に成功した。さらに、光開始剤とパターン UV 照射装置、あるいは二光子顕微鏡システムを利用することで、ヒト多能性幹細胞の培養や分



光によるハイドロゲルの硬さ制御（左）および細胞外力学環境の微細加工によるヒト ES 細胞分化の空間パターンの制御（右）

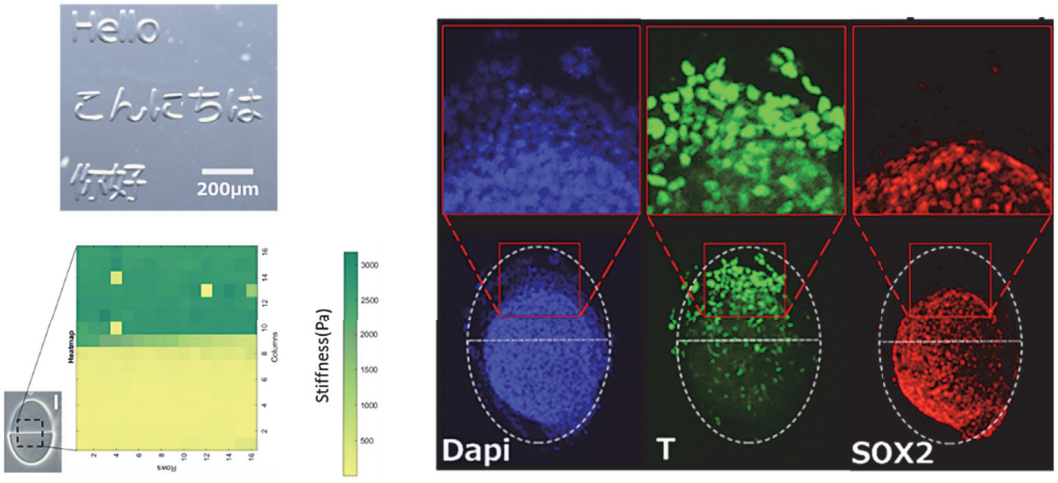
化に適した 2D および 3D 構造を持つゲルを形成することができた。

幹細胞は周囲の環境を感知し、それに応答することが知られている。そこで、開発したハイドロゲルを用いて、硬さの異なる環境に多能性幹細胞がどのように反応するかを調べた。その結果、ゲルの硬さは多能性幹細胞の遺伝子プロファイルだけでなく、細胞の分化特性にも影響を与えることが明らかになった。特に、中胚葉分化では柔らかい基質が好まれる傾向があった。このことに基づき、私たちはゲルの硬さを空間的に調節し、局所的な中胚葉分化を誘導し、幹細胞の運命を空間制御することを試みた。片側が柔らかい楕円形のゲルを作成し、その上で細胞を分化した結果、柔らかい部分にいる細胞は中胚葉マーカーの発現を示したが、固いほうでは分化は観察されず、ハイドロゲル材料を用いた細胞分化の空間制御に世界で初めて成功した（Wang et al., in rivision）。

このように、我々が開発した材料は、幹細胞の運命を空間的に制御し、複雑な組織や臓器の再現を可能とした。今後は幹細胞工学や再生医療の分野において適応範囲を広げていく予定である。

The process of organogenesis in the brain, retina, and other organs is a highly complex phenomenon involving cell proliferation, differentiation, and migration. To understand the principles of organogenesis and to reproduce functional organ formation in vitro, we have been developing means for in vitro organ formation from pluripotent stem cells（ES/iPS cells）. We are also working to elucidate the molecular mechanisms that control the differentiation process and organ morphogenesis of diverse cell types. This year, we developed a polymeric material for recapitulating early embryogenesis in human pluripotent stem cell culture. We developed a technique for spatial manipulation of stem cell differentiation on hydrogel material.

It is necessary to control the extracellular environment to create complex tissues and organs in vitro. The extracellular environment is not uniform during organogenesis, and its chemical and mechanical environments change dynamically. Current stem cell differentiation systems often use rigid plastic culture



Control of hydrogel stiffness by light (left) and control of spatial patterns of human ES cell differentiation by microfabrication of extracellular mechanical environment (right)

ware, which cannot accurately recapitulate the actual internal environment of the body. To overcome these problems, we have studied to develop novel light-curable polymeric materials suitable for human pluripotent stem cell culture.

As a result, we succeeded in developing a novel hydrogel material that is biocompatible and whose stiffness and structure can be precisely controlled by light on a micron scale. Furthermore, using a patterned UV irradiation system or a two-photon microscope system, they could form gels with specific 2D and 3D structures suitable for maintaining and differentiating human pluripotent stem cells.

Stem cells are known to sense and respond to their surrounding environment. Therefore, we investigated how pluripotent stem cells respond to environments with different stiffness using the developed hydrogels. The results revealed that gel stiffness affects the transcriptome of pluripotent stem cells and their differentiation characteristics. In particular, soft substrates tended to be preferred for mesendodermal differentiation. Based on this, we attempted to spatially regulate gel stiffness to induce local mesoderm differentiation and spatially control stem cell fate. A soft oval gel with one side was prepared, and cells were differentiated on it. As a result, cells in the soft part showed expression of mesodermal markers. Still, no differentiation was observed in the hard part, and we succeeded f in the spatial manipulation of cell differentiation using hydrogel materials（Wang et al., in revision）.

Thus, the material we developed can spatially control the fate of stem cells and enable complex pattern formation in stem cell culture. In the future, we plan to expand the scope of this application in stem cell engineering and regenerative medicine.

List of Publications

Kanadome, T., Hayashi, K., Seto, Y., Eiraku, M., Nakajima, K., Nagai, N., & Matsuda, T.（2022）. Development of intensiometric indicators for visualizing N-cadherin interaction across cells. ***Communications Biology***, 5（1）, 1065-1065

Martínez-Ara, G., Taberner, N., Takayama, M., Sandaltzopoulou, E., Villava, C., Bosch-Padrós, M., Takata, N., Trepat, X., Eiraku, M., & Ebisuya, M.（2022）. Optogenetic control of apical constriction induces synthetic morphogenesis in mammalian tissues. ***Nature Communications***, 13（1）

Ohgushi, M., Taniyama, N., Vandenbon, A., & Eiraku, M.（2022）. Delamination of trophoblast like syncytia from the amniotic ectodermal analogue in human primed embryonic stem cell-based differentiation model. ***Cell reports,*** 39（12）, 110973

List of Presentations

Eiraku, M. Neural Development in Stem Cell Culture. International Symposium on Neural Development and

Diseases. Kyoto, March 15-17, 2023

Eiraku, M. Neural Development in Stem Cell Culture. The 21st Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience Towards Understanding Human Development and Evolution. Osaka, January 27-28, 2023

Seto Y, Takizawa K, Eiraku M. *In vitro* induction of craniofacial primordial cell-like cells from human pluripotent stem cells for understanding the molecular mechanism of facial tissue patterning and obtaining cell resource for regenerative medicine, The 21st Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience Towards Understanding Human Development and Evolution. Osaka, January 27-28, 2023

Ohgushi M. Exploring extraembryonic differentiation using human primed pluripotent stem cells, East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Online, October 26-28, 2022

Eiraku, M. Neural tissue development in stem cell culture. ISN-APSN 2022.Hawaii, August 28-September 1, 2022

Ohgushi M. Exploring extraembryonic differentiation using primed human ESCs, The 7th Primate Development Seminar. Online, August 19, 2022

Eiraku, M. Mechanical forces in morphogenesis. 24th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Onsite（Vancouver）-Online, May 7-10, 2022

Eiraku, M. Neural Development in Stem Cell Culture. The International Symposium Development and Plasticity of Neural Systems. Kyoto, March 14-17, 2022

Eiraku, M. Neural Development in Stem Cell Culture. BDR Symposium. Kobe, March 1-3, 2022

永樂元次　幹細胞からの機能的組織形成技術　KIPS 高分子講座 2022、京都市、2023 年 2 月 10 日

永樂元次　網羅的な遺伝子で集うデータに基づくヒト初期発生の遺伝子制御ネットワークの解明　第 45 回日本分子生物学会年会、千葉市、2022 年 11 月 30-12 月 2 日

永樂元次　1 細胞解析のための細胞表面修飾手法の開発　日本化学繊維研究所第 80 回講演会、京都市 - ウェブ（ハイブリッド）開催、2022 年 11 月 9 日

永樂元次　多能性幹細胞からの機能的組織誘導　創立 100 周年記念 第 74 回日本生物工学会大会、ウェブ開催、2022 年 10 月 17-20 日

永樂元次　上気道オルガノイドを用いた SARS-CoV2 に対する新規感染モデルの開発と感染機構の解明　第 1 回 CREST・さきがけ横断シンポジウム - コロナ関連研究を中心に -、ウェブ開催、2022 年 10 月 14 日

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

RNA システム分野
Laboratory of RNA System

助　教　　谷口　一郎　　Assist. Prof.　Ichiro Taniguchi

RNA は細胞の中ではタンパク質との複合体 RNP（ribonucleoprotein complex）として存在する。本分野では、RNP の生成（誕生）・機能発現（日常生活）・解体（死）といった「RNP の一生」に関わる生命科学の現象を広く研究している。2022 年度においては、RNA ポリメラーゼⅡ転写産物の核内における振り分けに関する分子機構を解明した。

1）HNRNPC による RNA ポリメラーゼⅡ転写産物の振り分け機構

真核細胞では、核内で合成された多くの種類の RNA は細胞質へ輸送される。その際、RNA はそれぞれの種類に対応した特異的な輸送タンパク質因子群と RNP を形成する。それらのタンパク質因子は RNA を輸送するだけではなく、輸送後の RNA の機能や局在に影響を与える。したがって、輸送前に RNA が RNA 種ごとに適切に分類される機構は遺伝子発現に重要である。我々は以前、RNA ポリメラーゼ II の転写物がその長さに応じて分類されることを報告し、hnRNP C タンパク質が重要な分類因子であることを明らかにした（McCloskey et al., Science, 2012）。すなわち、hnRNP C は U snRNA 輸送のアダプタータンパク質である PHAX の長い転写物へのリクルートを阻害することにより、その RNA を mRNA 輸送経路へ誘導する。しかし、hnRNP C が PHAX の mRNA 上へのリクルートを阻害する分子機構は不明なままである。そこで、RNA の分類機構をより詳細に理解するために、hnRNP C の様々な変異体を作製し、試験管内でのタンパク質 - タンパク質間結合および RNA- タンパク質間結合実験を行った。その結果、hnRNP C とキャップ結合複合体（CBC）が mRNA 上で直接相互作用することを見出した。また、hnRNP C が長い RNA への PHAX の結合を阻害するためには、hnRNP C の塩基性領域とロイシンジッパードメインが必要であることも明らかにした。さらに、hnRNP C の RNA 結合活性には、4 量体の形成が重要であることもわかった。以上の結果から、hnRNP C の 4 量体はある閾値以上の長さの RNA 上で CBC と直接相互作用し、キャップ構造から隙間なく RNA を巻き付けることによって、PHAX の mRNA 上へのリクルートを阻害するというモデルを提唱した（Fig. 1）。

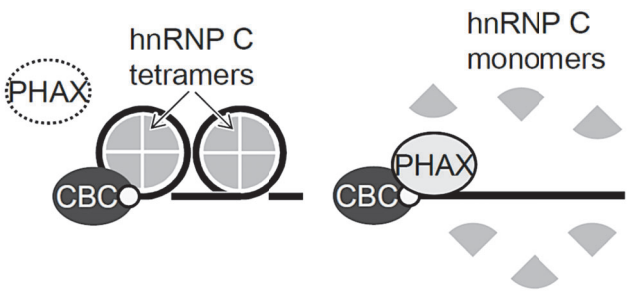


Fig. 1. The inhibitory effects of hnRNP C on the recruitment of PHAX onto mRNA

2）HNRNPC を RNA から解離する因子の発見

我々は以前、試験管内反応系において hnRNP C が mRNA 輸送因子である ALYREF の mRNA へのリクルートを阻害することを報告した（McCloskey et al., Science, 2012）。このことは、細胞は mRNA の核外輸送を誘導するために hnRNP C を ALYREF に置き換える機構を持つことを示唆している。しかし、hnRNP C が mRNA からどのように取り除かれるかは不明である。その分子機構を解明するために、HeLa 細胞核抽出液を用いて、mRNA から hnRNP C を除去する試験管内反応系を開発した。その結果、何らかの RNA ヘリカーゼが hnRNP C の解離に関与することが示唆された。現在、独自の試験管内反応系を利用して、hnRNP C を解離する RNA ヘリカーゼを探索中である。今後、その RNA ヘリカーゼが細胞内で hnRNP C と mRNA の解離に関与しているかを検証する。

RNA and RNA-binding proteins form ribonucleoprotein complexes（RNPs）. We are studying a wide range of biological phenomena related to the life cycle of RNPs, including their formation（birth）, functional expression（daily life）, and disassembly（death）. In 2022, we elucidated the molecular mechanism of sorting of RNA polymerase II transcripts. We also addressed how stable RNPs are disassembled.

1）Sorting mechanism of RNA polymerase II transcripts

In eukaryotic cells, various RNA classes are exported to the cytoplasm by their specific factors. Accumulating evidence shows that export factors affect the fate of RNA, demonstrating the importance of proper RNA classification upon export. We previously reported the classification of RNA polymerase II transcripts according to their length and identified heterogeneous nuclear ribonucleoprotein（hnRNP）C as the key classification factor. HnRNP C inhibits the recruitment of PHAX, an adapter protein for spliceosomal U snRNA export, to long transcripts, navigating them to the mRNA export pathway（McCloskey et al., Science, 2012）. However, the mechanisms by which hnRNP C inhibits PHAX recruitment to mRNA remain unknown. To obtain a more detailed understanding of RNA classification mechanisms, we constructed hnRNP C mutants, and extensively performed in vitro protein-protein and RNA-protein binding assays. We found that the cap-binding complex（CBC）, a bridging factor between m^7G-capped RNA and PHAX, directly interacted with hnRNP C on mRNA. We also showed that its basic RNA-binding（BASIC）region and leucine zipper（ZIPPER）domain were required for hnRNP C to inhibit PHAX binding to longer RNAs. Furthermore, we found that the formation of tetramers was crucial for the RNA-binding activity of hnRNP C. Based on the results obtained, the following model was proposed: RNA longer than a certain threshold is wrapped around the tetramer without a gap from the cap through a direct interaction with CBC, thereby inhibiting the access of PHAX.

2）Searching for factors that remove hnRNP C from RNA

We previously reported that hnRNP C obstructed the recruitment of ALYREF to mRNA in vitro（McCloskey et al., Science, 2012）. This suggests that cells have mechanisms to replace hnRNP C with

ALYREF to induce nuclear export of mRNA. However, how hnRNP C is removed from mRNA is unknown. To elucidate the mechanism, we first developed an in vitro system for the removal of hnRNP C from mRNA. We found that some RNA helicase is involved in the removal of hnRNP C. We are searching for the helicase and investigating whether it is involved in the dissociation of hnRNP C from mRNA in vivo.

List of Publication

Sayaka Dantsuji, S., Ohno, M., and Taniguchi, I.（2023）. The hnRNP C tetramer binds to CBC on mRNA and impedes PHAX recruitment for the classification of RNA polymerase II transcripts. **Nucleic Acids Res.** 51（3）:1393-1408.

List of Presentations

谷口一郎、大野睦人　Searching for factors that remove hnRNP C from RNA. 第 23 回日本 RNA 学会年会、京都、2022 年 7 月 20-22 日

壇辻さやか、大野睦人、谷口一郎　The hnRNP C tetramer binds to CBC on mRNA and impedes PHAX recruitment for the classification of RNA polymerase II transcripts. 第 23 回日本 RNA 学会年会、京都、2022 年 7 月 20-22 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。2022 年は、大腸菌の S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP とそのホモログの構造を解明し、RseP のダイナミックな構造変化を伴う基質切断機構のモデルを提唱しました。また、タンパク質の膜透過に働く膜タンパク質 YfgM と PpiD の相互作用と機能を解析し、これらが機能的複合体を形成して働くことを示しました。

1）膜内切断プロテアーゼ RseP の全長構造決定とそれに基づく基質切断機構モデルの提案

タンパク質の「膜内切断」は、特殊な膜内在性酵素を介して膜貫通タンパク質が生体膜脂質二重層内部で加水分解されるという現象である。これはシグナル分子の切断を介したコレステロール代謝や細胞分化、免疫応答等の制御や、微生物病原性発現など、ヒトから細菌に至るまで多様な生体プロセスに関与し、その不全はアルツハイマー病やパーキンソン病、様々な細菌感染症等の発症原因ともなる。大腸菌膜内切断プロテアーゼである RseP は、基質の膜内切断を介して細胞表層ストレス応答や鉄の代謝制御、細胞膜の品質管理に関与し、大腸菌の生育に必須のタンパク質である。本研究では、RseP の基質認識及び切断機構の全体像を明らかにするため、横浜市立大学の禾晃和博士らとの共同研究により RseP の X 線結晶構造解析に取り組み、RseP 全長と阻害剤 batimastat（BAT）の複合体構造を明らかにした。得られた複合体構造に基づいた変異体機能解析や阻害剤感受性アッセイを行い、阻害剤 BAT の作用機序及び基質結合様式を明らかにした。また、異種の細

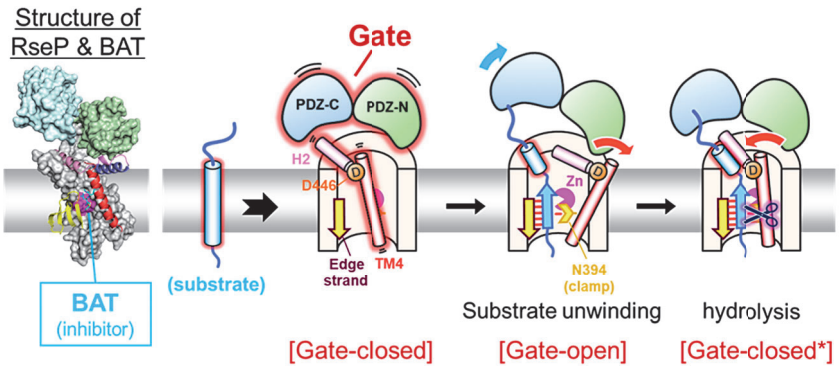


Fig. 1. Proposed gating model for substrate accommodation and intramembrane proteolysis of *E. coli* RseP

菌 RseP ホモログについても構造決定し、立体構造比較に基づいた変異解析や修飾実験によるドメイン構造解析から RseP がゲート様構造を保有し、その構造が可動性を持つ可能性を示唆した。さらに、分子内架橋形成によりゲートの構造変化を制限すると基質切断能が低下したことから、このゲートの可動性が効率的な基質切断に重要であることを示した。これらの結果から、基質膜タンパク質を取り込む際にゲート構造が開閉することで、基質の触媒部位への提示及びその切断を制御するという RseP の新たな切断制御モデルを提案した（Imaizumi *et al*., 2022, *Sci. Adv.* 8, eabp9011）。これらの知見は、膜内切断プロテアーゼを標的とする、疾病や感染症治療薬の薬剤開発の分子基盤となることが期待される。

2）内膜タンパク質 YfgM-PpiD ヘテロ二量体は、SecY/E/G トランスロコンと相互作用しタンパク質膜透過を促進する機能ユニットとして働く

PpiD と YfgM は、いずれも N 末に膜貫通領域を持ち C 末に大きなペリプラズムドメインを有する内膜タンパク質である。大腸菌の YfgM と PpiD は安定な複合体を形成し、タンパク質膜透過反応時に基質分子の通り道を形成する SecY/E/G translocon と相互作用する。PpiD がタンパク質膜透過反応に寄与することは知られていたものの、PpiD と YfgM の間、あるいは PpiD/YfgM 複合体と Sec translocon の間の相互作用の様式や PpiD-YfgM 複合体形成の機能的役割についてはこれまで不明だった。本研究において我々は、奈良先端科学技術大学院大学の宮崎亮次博士との共同研究として、*yfgM* と *ppiD* の変異株を用いた遺伝学的・生化学的解析を進めた。その結果、*yfgM* の欠失により、PpiD の C 末領域が一部分解を受けること、ビブリオ菌の分泌モニター因子 VemP の膜透過をビブリオ菌中と大腸菌中どちらの場合においても阻害することを見いだした。*ppiD* の欠失もまた VemP の膜透過を阻害するものの、両遺伝子の二重欠失株においては VemP の膜透過の付加的もしくは相乗的な阻害効果は見られなかった。これらの結果は、PpiD と YfgM の両者が、VemP の効率良い膜透過に必要であることを強く示している。さらに、部位特異的 *in vivo* 光架橋実験の結果から、YfgM 内のテトラトリコペプチドリピートドメインと PpiD 内の構造的に保存されたドメイン（NC domain）が互いに相互作用していること、PpiD の場合と同様に YfgM もトランスロコンのサブユニットである SecG と直接相互作用していることを明らかにした。これらの結果は、AlphaFold2 により予測された SecY/E/G-PpiD/YfgM 超複合体の構造モデルと良く合致していた（Fig.2 参照）。更なる架橋実験の結果から、PpiD-YfgM 複合体の形成が、両因子と SecG との相互作用に必要であることも示した。以上の結果から、PpiD-YfgM 複合体は、Sec トランスロコンとの適切な相互作用を介してタンパク質膜透過を促進する機能ユニットとして働くとの作業仮説を提案した。

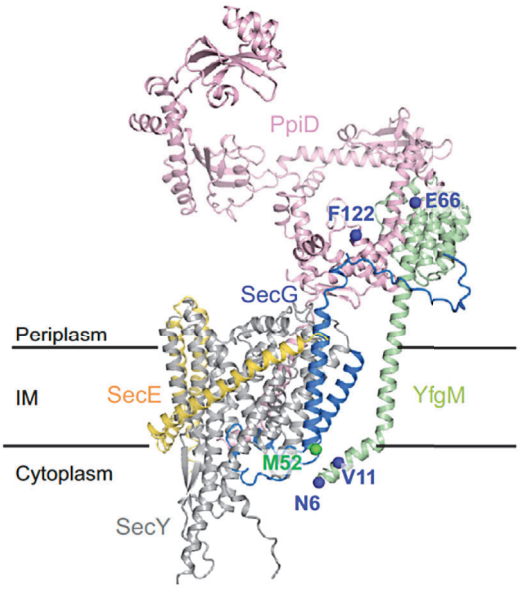


Fig. 2. Structure model of the SecY/E/G-PpiD/YfgM super complex

本年は、理学研究科修士課程大学院生として、山田 高輝さんが新たに研究室に加わり、一方、小林 達也さんと池田 優希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。

Research in this laboratory focuses on 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 using combined molecular genetic, biochemical, biophysical, and structural approaches. In 2022, we determined the structure of the *E. coli* S2P family protease and its bacterial homolog and proposed a model for substrate cleavage accompanied by dynamic structural changes of RseP. In addition, we showed that *E. coli* membrane proteins YfgM and PpiD form a complex and act as a functional unit in protein translocation across the cytoplasmic membrane.

1）Crystal structure of the intramembrane protease RseP and novel mechanistic model for substrate accommodation and its intramembrane proteolysis

Intramembrane proteolysis plays a critical role in various cellular processes, such as lipid metabolism, cell differentiation, immune response, and microbial pathogenesis, in a wide range of organisms. RseP, the S2P-family intramembrane protease of *E. coli*, is responsible for the regulation of the σ^E pathway extracytoplasmic stress response and iron uptake through the intramembrane cleavage of the regulatory proteins, and for the degradation of remnant signal peptides of secreted proteins. Here, in collaboration with Dr. Terukazu Nogi's group at Yokohama City University, we determined the crystal structures of *E. coli* RseP and the RseP orthologue from the marine bacterium, both with a peptide-mimetic inhibitor batimastat（BAT）. The solved RseP structures and structure-based mutational and biochemical analyses in *E. coli* provided a clue to understand how RseP interacts with a substrate or a BAT in the intramembrane active site and suggested a gating mechanism for substrate entry into the hydrophilic proteolytic active site chamber formed inside the membrane. Substrate cleavage efficiency decreased significantly when a conformational change of the possible gate was restricted by intramolecular cross-linking, highlighting the importance of the gate movability for efficient substrate cleavage. Based on these results, we propose a new model for the mechanism of intramembrane substrate cleavage by RseP, in which the dynamic conformational change of the substrate entry gate enhances substrate access and presentation to the catalytic site（Imaizumi *et al*., 2022, Sci. Adv. *8*, eabp9011）.

2）YfgM–PpiD heterodimer acts as a functional unit that associates with the SecY/E/G translocon and promotes protein translocation

PpiD and YfgM are inner membrane proteins that are both composed of an N-terminal transmembrane segment and a C-terminal periplasmic domain. *Escherichia coli* YfgM and PpiD form a stable complex that interacts with the SecY/E/G（Sec）translocon, a channel that allows protein translocation across the

cytoplasmic membrane. Although PpiD is known to function in protein translocation, the functional significance of PpiD–YfgM complex formation and the molecular mechanisms of PpiD–YfgM and PpiD/YfgM–Sec translocon interactions remain unclear. In this study, we conducted genetic and biochemical studies using *yfgM* and *ppiD* mutants in a collaboration with Dr. Ryoji Miyazaki, Nara Institute of Science and Technology, and demonstrated that a lack of YfgM caused partial PpiD degradation at its C-terminal region and retarded the membrane translocation of VemP, a *Vibrio* secretory protein in both *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus*. While *ppiD* disruption also impaired VemP translocation, *yfgM* and *ppiD* double deletion exhibited no additive or synergistic effects. Together, these results strongly suggest that both PpiD and YfgM are required for efficient VemP translocation. Furthermore, site-directed *in vivo* photo-crosslinking analysis revealed that the tetratricopeptide repeat domain of YfgM and a conserved structural domain（NC domain）in PpiD interact with each other and that YfgM, like PpiD, directly interacts with the SecG translocon subunit. These results nicely fit the structure model of the SecY/E/G-PpiD/YfgM super complex predicted by AlphaFold2（See Fig. 2）. Crosslinking analysis also suggested that PpiD/YfgM complex formation is required for these proteins to interact with SecG. In summary, we propose that PpiD and YfgM form a functional unit that stimulates protein translocation by facilitating proper interactions with the Sec translocon（Miyazaki *et al.,* 2022, J. Biol. Chem. *298*, 102572）.

List of Publications

Miyazaki, R., Ai, M.[a], Tanaka, N.[a], Suzuki, T., Dhomae, N., Tsukazaki, T., Akiyama, Y., and Mori, H.（2022）. Inner membrane YfgM–PpiD heterodimer acts as a functional unit that associates with the SecY/E/G translocon and promotes protein translocation. J. Biol. Chem. *298*, 102572. [a]equally contributed

Imaizumi, Y.[a], Takanuki, K.[a], Miyake, T.[a], Takemoto, M., Hirata, K., Hirose, M., Oi, R., Kobayashi, T., Miyoshi, K., Aruga, R., Yokoyama, T., Katagiri, S., Matsuura, H., Iwasaki, K., Kato, K., Kaneko, M. K, Kato, Y., Tajiri, M., Akashi, S., Nureki, N., Hizukuri, Y., Akiyama, Y., and Nogi, T.（2022）. Mechanistic insights into intramembrane proteolysis by *E. coli* site-2 protease homolog RseP. Sci. Adv. *8*, eabp9011. [a]equally contributed

Qiao, Z., Yokoyama, T., Yan, X.-F., Beh, I. T., Shi, J., Basek, S., Akiyama, Y., and Gao, Y.-G.（2022）. Cryo-EM structure of an entire AAA protease complex FtsH-HflKC. Cell reports *39*, 110890.

Myazaki, R., Mori, H., and Akiyama, Y.（2022）. A photo-crosslinking approach to monitor assembly of an LptD intermediate with LptE in a living cell. Lipopolysaccharide Transport-Methods and Protocols, Methods Mol. Biol. *2548*, 97-107.

List of Presentation

横山達彦　大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP は FecR の切断を介して鉄獲得系遺伝子の転写を活性

化する　2021 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの複製と維持における生体高分子の機能」2022 年 3 月 8–9 日

三宅拓也　大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の膜表在・両親媒性ヘリックスの基質選別・切断への関与 2021 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの複製と維持における生体高分子の機能」2022 年 3 月 8–9 日

檜作洋平　立体構造に基づく膜内切断プロテアーゼ RseP の基質取り込み・切断制御機構　2021 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの複製と維持における生体高分子の機能」2022 年 3 月 8–9 日

檜作洋平，横山達彦，三宅拓也，小林達也，今泉友希，高貫一徳，大井里香，禾晃和，秋山芳展シンポジウム「バクテリアの表層変化と生存戦略」細菌パーシスター化における膜内切断プロテアーゼ RseP の役割：生理学的及び構造学的アプローチ　第 95 回 日本細菌学会総会 2022 年 3 月 29–31 日

横山達彦、秋山芳展　グラム陰性細菌が環境の鉄を感知する分子機構 ～大腸菌鉄獲得系のシグナル伝達を担う一回膜貫通タンパク質 FecR の膜挿入と連続的切断反応の解析～　第 18 回大腸菌研究会、富山、2022 年 6 月 27–28 日

今泉友希、高貫一徳、大井里香、坂口（田村）梨沙子、三好賢一、有賀 理江、廣瀬建、片桐静夏、三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展、禾晃和　膜内タンパク質切断の制御機構の解明に向けた細菌由来 Site-2 protease の構造 生物学的研究　第 18 回大腸菌研究会、富山、2022 年 6 月 27–28 日

三宅拓也、今泉友希、髙貫一徳、小林達也、横山達彦、大井里香、檜作 洋平、禾晃和、秋山芳展全長結晶構造に基づく菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質取り込み・切断機 構の解析　第 18 回大腸菌研究会、富山、2022 年 6 月 27–28 日

池田優希、秋山芳展、森 博幸　VemP-Bla レポーター系を用いた分泌モニター因子 VemP の翻訳停止の解除に関わる cis-element, trans 因子の同定とその作用機序の解明 第 18 回大腸菌研究会、富山、2022 年 6 月 27–28 日

三宅 拓也、今泉 友希、高貫 一徳、小林 達也、横山 達彦、大井 里香、檜作 洋平、禾 晃和、秋山 芳展　細菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質取り込み・切断時におけるダイナミックな構造変化モデル　第 95 会日本生化学会大会、名古屋、2022 年 11 月 9–11 日

小林 達也、三宅 拓也、今泉 友希、高貫 一徳、横山 達彦、大井 里香、檜作 洋平、禾 晃和、秋山 芳展　大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の TM4 領域に着目した基質エントリーゲートの制御機構の検証　第 95 会日本生化学会大会、名古屋、2022 年 11 月 9–11 日

檜作 洋平、古味 大雄、秋山 芳展　大腸菌 S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の切断基質の系統的解析による基質認識・切断特異性の検証　第 95 会日本生化学会大会、名古屋、2022 年 11 月 9–11 日

石井英治、秋山芳展、森博幸　翻訳アレストペプチド VemP を介した遺伝子発現制御における転写産物の動態解析　第 45 回日本分子生物学会年会、2022 年 11 月 30–12 月 2 日

檜作 洋平 膜内切断プロテアーゼ RseP のゲーティング機構モデルの検証と基質特異的認識に関する解析　2022 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞生物に見られる生体プロセスの恒常性維持システム」、三島、2023 年 3 月 30–31 日

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

組織恒常性システム分野
Laboratory of Tissue Homeostasis

教　授	**豊島　文子**	**Prof.**	**Fumiko Toyoshima**
准教授	**アレクシス　バンデンボン**	**Assoc. Prof.**	**Alexis Vandenbon**
助　教	**石橋　理基**	**Assist. Prof.**	**Riki Ishibashi**
助　教	**小林　芳彦**	**Assist. Prof.**	**Yoshihiko Kobayashi**
助　教	**一條　　遼**	**Assist. Prof.**	**Ryo Ichijo**

本分野では、妊娠や加齢などのライフステージの進行に伴う臓器リモデリング機構について、組織幹細胞、多細胞・多臓器間ネットワーク、メカノバイオロジー、単一細胞トランスクリプトミクスの観点から解析している。Vandenbon グループでは、空間トランスクリプトーム等のバイオインフォマティクス解析を進めている。

1）血管退縮による真皮の硬化が表皮幹細胞の加齢変容を誘導する（豊島グループ）

表皮幹細胞は加齢によって機能が低下し、基底膜との接着が弱くなり細胞分裂の方向性も異常になることが知られている。この表皮幹細胞の加齢変容は、酸化ストレスなどによって生じる DNA 損傷など細胞内部の変化が要因であることが報告されていた。しかし、表皮幹細胞を取りまく周囲の環境の変化やそれらが表皮幹細胞に及ぼす影響については未解明であった。本研究では、生体マウスの足底部表皮幹細胞のカルシウムイメージングにより、高齢マウスでは若齢マウスに比べて、20 秒以上の長期にわたるカルシウムパルスが頻発していることを見出した。この原因として、細胞にかかる力学変化を感知して活性化するイオンチャネルが関わっているのではないかと考え、原子間力顕微鏡を用いて皮膚組織のかたさを測定したところ、高齢マウスでは若齢マウスよりも真皮が硬くなっていることが分った。さらに、基質のかたさを認識して活性化するメカノイオンチャネルである Piezo1 を表皮特異的にノックアウトすると、加齢で誘発される長期カルシウムパルスが抑制されるとともに、表皮幹細胞の加齢変容も抑制された。従って、加齢による真皮の硬化が表皮基底細胞での Piezo1 の持続的活性化を誘導し、カルシウムが持続的に流入することによって、表皮幹細胞の加齢変容が誘発されることが明らかとなった。また、加齢による真皮硬化は、体表血管の減少に起因することを見出し、人為的に血管を増加させると、加齢に伴う真皮の硬化が抑制され、表皮幹細胞の加齢変容も抑制されることが分かった。次に、加齢に伴う血管減少の原因因子を探索した結果、高齢マウスでは血管新生阻害作用を持つ分泌因子である Pentraxin 3（Ptx3）を高発現する線維芽細胞の割合が増加していることを見出した。Ptx3 ノックアウトマウスでは、加齢による血管減少が抑制され、真皮の硬化が改善され、表皮幹細胞の加齢変容も緩和されたことから、Ptx3 が皮膚加齢変容の原因因子の一つであることが明らかとなった。以上の結果から、加齢に伴い真皮線維芽

細胞から Ptx3 の発現が上昇し、それが血管の減少と真皮の硬化を誘導し、Piezo1 を介したカルシウムの長期流入による表皮幹細胞の加齢変容を誘発するという新たな皮膚老化機構が明らかとなった。

2）空間トランスクリプトミクスデータのバイオインフォマティクス解析（Vandenbon グループ）

空間トランスクリプトミクス技術を使用することで、組織内の細胞の空間的な配置やその組織と細胞の機能、遺伝子発現パターン、疾患状態との関連を解析することができる。私たちはこの技術を用いて、乳がんがマウスの肝臓組織の遺伝子発現に及ぼす影響を解析した（Vandenbon et al.、Commun. Biol.、2023）。10X Genomics Visium データのバイオインフォマティクス解析により、がんが宿主個体の肝臓の空間的遺伝子発現パターンを撹乱することを発見した（図 1）。例えば、異物質分解に関わる遺伝子の空間的な発現パターンは、がんによってほぼ失われていた。さらに、急性期応答にかかわる遺伝子の発現や活性化された好中球の配置にも空間的なパターンが確認できた。現在、空間トランスクリプトミクスデータを用いて、他のがん種が肝臓の遺伝子発現に及ぼす影響や、転移がヒトのリンパ節における遺伝子発現に与える影響を解析している。さらに、ヒトとマウスの多様な組織を網羅する空間トランスクリプトミクスデータベースの構築を進めている。また、空間トランスクリプトミクスや他のシングルセルデータセットの探索的解析のためのバイオインフォマティクス手法の開発も行っている（Vandenbon and Diez、査読中）。

他の共同研究プロジェクトとして、様々な免疫プロセスや分化に関連するシングルセル RNA-seq データの解析に貢献した（Chong et al., Science Signaling, 2022, Tse et al., Science Translational Medicine, 2022, Ohgushi et al., Cell Reports, 2022）。

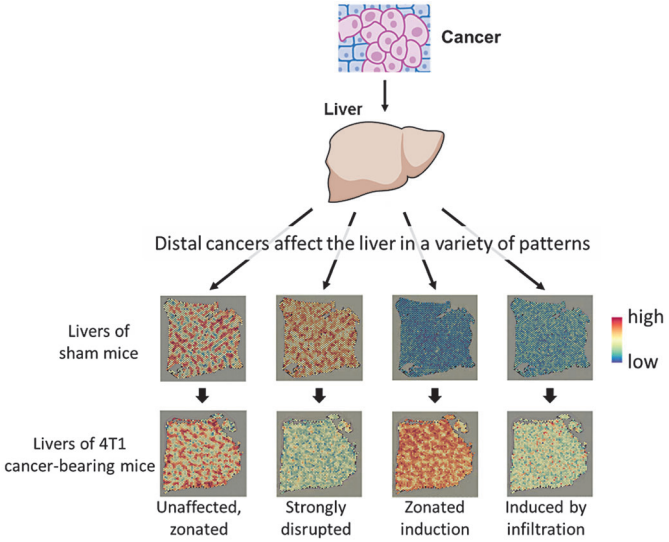


Figure 1: Spatial transcriptomics data revealed how a distal 4T1 cancer affects biological pathways in the liver in a variety of patterns. From left to right: 1）the zonated expression of Albumin is relatively unaffected. 2）Some pathways, such as genes involved in xenobiotic catabolism are strongly disrupted. 3）Acute phase response genes are strongly induced in hepatocytes and follow a zonated pattern. 4）A subset of immune-related genes is induced in the liver through the infiltration of neutrophils.

Toyoshima group aims to elucidate the mechanism of organ remodelling in response to physiological changes in the body. In particular, we focus on organ remodelling during pregnancy and aging from the perspectives of tissue stem cell dynamics, multicellular / multiorgan network, and mechanobiology. Vandenbon group is analysing and developing bioinformatics methods for spatial transcriptomics data.

1）Vasculature atrophy causes stiffened dermis that causes epidermal stem cell disfunction in aged skin

Stem cell dysfunction causes tissue deterioration associated with aging. The accumulation of DNA damage is an intrinsic cue for stem cell dysfunction. However, whether there is an external microenvironmental cue that triggers stem cell dysfunction remains obscure. We found that vasculature involution causes dermal stiffening that results in premature differentiation and hemidesmosome fragility of interfollicular epidermal stem cells（IFESCs）in aged mouse skin. Aging-related IFESC dysfunction is correlated with prolonged calcium influx, which is contributed by the mechanoresponsive ion channel Piezo1. Epidermal deletion of Piezo1 ameliorated IFESC dysfunction in aged skin, whereas Piezo1 activation augmented IFESC differentiation and hemidesmosome fragility in young mice. The dermis stiffened with age, which was accompanied by dermal vasculature atrophy. Conversely, induction of the dermal vasculature softened the dermis and ameliorated IFESC dysfunction in aged skin. Single-cell RNA sequencing of dermal fibroblasts identified an aging-associated anti-angiogenetic secretory molecule, Pentraxin 3, which caused dermal sclerotization and IFESC dysregulation in aged skin. Our findings show that the vasculature softens the microenvironment for stem cell maintenance and provide a potential mechanobiology-based therapeutic strategy against skin disorders in aging（Ichijo *et al.*, Nature Aging 2022）.

2）Bioinformatics analysis of spatial transcriptomics data（Vandenbon）

Spatial transcriptomics technology allows researchers to study the spatial organization of cells within tissues and how this organization relates to cellular function, gene expression patterns, and disease states. We have used this technology to investigate the effect of breast cancer on gene expression in liver tissues in mice（Vandenbon *et al.*, *Commun. Biol.*, 2023）. Using bioinformatics analysis of several 10X Genomics Visium liver samples, we found that distal cancers affect the zonated patterns of gene expression in liver in various distinct manners（Fig. 1）. For example, the spatial gene expression pattern of genes involved in xenobiotic catabolic processes was strongly disrupted. The acute phase response genes were induced in a zonated pattern. Furthermore, breast cancers also activated neutrophils in distinct zonated manners. In addition, we are currently using spatial transcriptomics data to analyze the effect of other cancer types on gene expression in the liver, as well as the effect of metastasis on gene expression in human lymph nodes. Moreover, we are preparing the construction of a comprehensive database of spatial transcriptomics datasets covering a large number of human and mouse tissues. We are also developing bioinformatics methods for the exploratory analysis of spatial transcriptomics and other single-cell datasets（Vandenbon and Diez, under review）.

In addition to the above bioinformatics-oriented project, we have contributed to multiple interdisciplinary collaborations, including the analysis of single-cell RNA-seq data related to various immune processes and differentiation（Chong *et al.*, Science Signaling, 2022, Tse *et al.*, Science Translational Medicine, 2022, Ohgushi *et al.*, Cell Reports, 2022）.

List of Publications

Ishibashi R, Ritsuko M, Kitano S, Miyachi H, Toyoshima F.（2022）. Development of an in vivo cleavable donor plasmid for targeted transgene integration by CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cas12a **Sci. Rep.** *12*, 17775.

Ichijo R, Maki K, Kabata M, Murata T, Nagasaka A, Ishihara S, Haga H, Honda T, Adachi T, Yamamoto T, Toyoshima F.（2022）. Vasculature atrophy causes a stiffened microenvironment that augments epidermal stem cell differentiation in aged skin. **Nat. Aging** *2*, 592-600.

Kozuki S, Sakurai S, Suzuki A, Yamamoto T, Toyoshima F.（2022）. Delineation of biliary epithelial cell dynamics in maternal liver during pregnancy. **Genes Cells**. *3*, 192-201.

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*, 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*, eabm5011.

Tse K.M., Vandenbon A., Cui X., Mino T., Uehata T., Yasuda K., Sato A., Tsujimura T., Hia F., Yoshinaga M., Kinoshita M., Okuno T. and Takeuchi O.（2022）. Manipulation of Regnase-1 expression with stem-loop-targeting antisense oligonucleotides alleviates inflammatory diseases. **Science Translational Medicine** *14,* eabo2137.

Ohgushi M., Taniyama N., Vandenbon A. and Eiraku M.,（2022）. Delamination of trophoblast-like syncytia from the amniotic ectodermal analogue in human primed embryonic stem cell-based differentiation model, **Cell Reports** *39*, 110973.

Yaku A., Inagaki T., Asano R., Okazawa M., Mori H., Sato A., Hia F., Masaki T., Manabe Y., Ishibashi T., Vandenbon A., Nakatsuka Y., Akaki K., Yoshinaga M., Uehata T., Mino T., Morita S., Ishibashi-Ueda H., Morinobu A., Tsujimura T., Ogo T., Nakaoka Y. and Takeuchi O.（2022）. Regnase-1 Prevents Pulmonary Arterial Hypertension via mRNA Degradation of IL-6 and PDGF in Alveolar Macrophages, **Circulation** *146*.

Yoshinaga M., Han K., Morgens D.W., Horii T., Kobayashi R., Tsuruyama T., Hia F., Yasukura S., Kajiya A., Cai T., Cruz P.H.C., Vandenbon A., Suzuki Y., Kawahara Y., Hatada I., Bassik M.C., Takeuchi O.（2022）. The N6-methyladenosine methyltransferase METTL16 enables erythropoiesis through safeguarding genome integrity. **Nature Communications** *13*, 6435.

Vandenbon A., Mizuno R., Konishi R., Onishi M., Musuda K., Kobayashi Y., Kawamoto H., Suzuki A., He C., Nakamura Y., Kawaguchi K., Toi M., Shimizu M., Tanaka Y., Suzuki Y. and Kawaoka S.（2023）. Murine breast cancers disorganize the liver transcriptome in a zonated manner, **Communications**

Biology *6*, 97.

Nakai K. and Vandenbon A.（2023）Higher-order chromatin structure and gene regulation, in Epigenetics in Organ Specific Disorders. **Academic Press**.

List of Presentations

小林芳彦　組織修復時に一過性に認められる上皮細胞種と、慢性呼吸器疾患におけるその蓄積、第62回日本呼吸器学会学術講演会、シンポジウム、京都　Web/ハイブリッド開催、2022年4月23日（招待講演）

豊島文子　Vasculature-dependent epidermal stem cell state organizes tissue scaling in dynamic skin、第19回幹細胞シンポジウム、淡路島　Web/ハイブリッド開催、2022年5月28日　（招待講演）

小林芳彦　Reservoir of tissue-resident stem cells regeneration of airway epithelium、第19回幹細胞シンポジウム、淡路島　Web/ハイブリッド開催、2022年5月28日　（招待講演）

小林芳彦　肺細胞組織修復過程に出現する一過性の上皮細胞状態、日本肺サーファクタント・界面医学会第58回学術研究会、シンポジウム、東京　web/ハイブリッド開催、2022年9月24日（招待講演）

Vandenbon A. Exploratory analysis of various single-cell and spatial transcriptomics data types, Institute for Quantitative Biosciences student seminar, the University of Tokyo（online）, September 29, 2022.（招待講演）

Toyoshima F Stiffened microenvironment induces epidermal stem cell differentiation in aged skin, The 28th EAJS on Biomedical Research, Web, October 26, 2022.（招待講演）

Toyoshima F Dermal stiffening causes epidermal stem cell dysfunction in aged skin, International Symposium on Mechanobiology for Human Health, Tokyo, March 22, 2023.（招待講演）

豊島文子　体の生理変化に伴う皮膚リモデリング機構、第52回日本創傷治癒学会、名古屋、2022年11月20日　（招待講演）

豊島文子　組織内力場から見た幹細胞老化　第22回日本再生医療学会総会、シンポジウム、京都Web/ハイブリッド開催、2023年3月25日（招待講演）

小林芳彦　細胞組織修復過程に一過性に出現する上皮細胞状態と、肺胞線維化との関係性、第22回日本再生医療学会総会、シンポジウム、京都Web/ハイブリッド開催、2023年3月23日（招待講演）

Vandenbon A. and Diez D., singleCellHaystack: a universal prediction tool for differential expression in single-cell and spatial omics data, NGS EXPO 2022, Osaka, 2022年10月18-19日 [Poster]

朴龍鶴　三量体Gタンパク質Gα13の新しい活性化機構（New activation mechanism of heterotrimeric

G protein Gα13）、第 95 回日本生化学会大会、名古屋　Web/ ハイブリッド開催、2022 年 11 月 9 日（水）～ 11 日（金）（ポスター）

石橋理基　CRISPR-Cas9 および CRISPR-Cas12a による in vivo 切断型高汎用性遺伝子ターゲッティング plasmid の開発、第 45 回日本分子生物学会年会、幕張　Web/ ハイブリッド開催、2022 年 11 月 30 日 -12 月 2 日（ポスター）

上月智司　妊娠初期に増殖する肝細胞の生理学的意義、第 45 回日本分子生物学会、幕張　Web/ ハイブリッド開催、2022 年 12 月 2 日（ポスター）

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	岡田　崇	Assoc. Prof.	Takashi Okada

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。

1）ERBB 受容体が作り出すシグナル伝達の多様な応答の起源を理論と実験の融合により解明

細胞表面でシグナル分子を受け取る受容体の 1 つのグループとして、ERBB1、ERBB2、ERBB3、ERBB4 からなる ERBB ファミリーがある。ERBB にシグナル分子が結合すると、2 つの ERBB 分子が結合した各種の二量体が形成され、二量体の間で互いをリン酸化する反応が起こり、これをきっかけとして細胞の増殖や分化などの多様な応答を引き起こすことが分かっている。ヒトでは組織が異なると、細胞が持つ 4 種の ERBB の量の組成が異なることが分かっており、これが組織ごとに異なる振る舞いを作り出していると考えられる。ところが、4 種の ERBB の結合反応やリン酸化反応の詳細を実験的に計測することは難しく、シグナルに対する応答の多様性がどのように作り出されるのか、分かっていなかった。

我々は、計測実験と数理モデルを組み合わせることで、4 種の ERBB がどのような反応特性を持ち、またシグナルを受け取ることでそれらがどのように変化するのか、初めて特定した。さらに、数理解析を進めることで、応答の多様性に本質的な役割をになう反応特性を明らかにした。まず実験において、ERBB の組成が異なる 7 種の細胞を用意し、それぞれに対して 2 種のシグナルを与えて、4 種の ERBB のリン酸化応答を計測した。次に、4 種の ERBB 分子の間に起こりうる全ての結

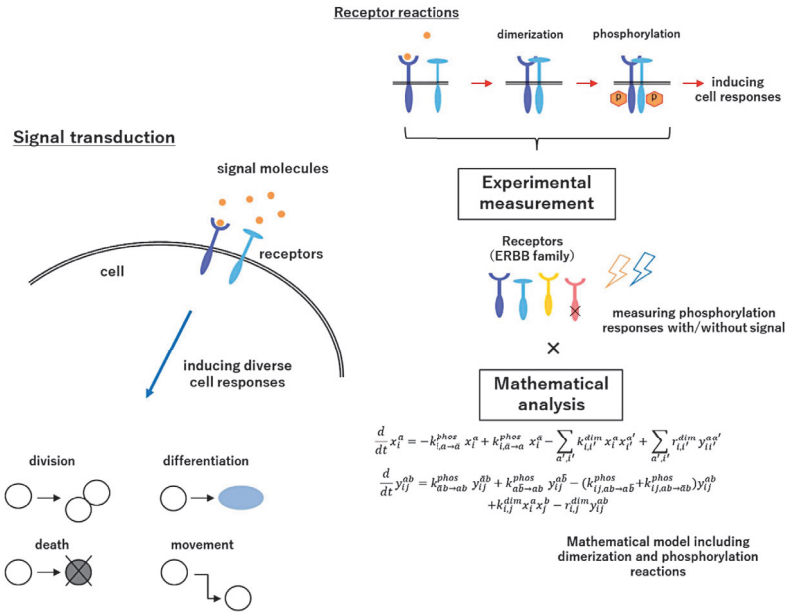


Fig. 1. Identify reaction properties of ERBB receptors and changes of them by signal molecules.

合反応と全てのリン酸化反応を取り入れた数理モデルを作り、計測結果と比較することで、それぞれの結合反応とリン酸化反応の速度定数を決定した。さらに、数理モデル上で速度定数を様々に変えたとき、リン酸化応答の多様性にどのような影響が現れるかを調べた。その結果、4 種の ERBB 分子の間でリン酸化反応速度が異なることが、応答の多様性に大きな効果をもたらしており、結合反応の違いは大きな要因とはなっていないことが分かった。4 種の ERBB は進化の過程で、主にリン酸化反応速度を多様化させることで、シグナル応答の多様性を実現したといえる。

2）花びらと葉の形の違いを作り出す細胞挙動の解明

一般に植物器官の形は、その器官を作る間に起きる細胞分裂のパターンで決まるとされている。我々は植物発生学者のグループとの共同研究により、シロイヌナズナの花びらと萼を対象に、形態の違いの起源を調べた。器官発生における細胞分裂の位置と角度を詳細に解析したところ、花びらと萼の間には、細胞分裂の位置でも角度でも異なる特徴が見つかった。

そこで、我々は数理モデルと数値シミュレーションを用いた解析を行った。花びらや萼ができてくる間の細胞分裂の位置をさまざまに変化させてみると、最終的な器官の形はそれに応じて大きく変化した。我々は、花びらしい形や萼らしい形を生む分裂頻度の空間分布の条件を明らかにした。一方で細胞分裂の角度をさまざまに変えても、花びらしさや萼らしさに対するその効果は限定的であった。この解析の結果から、花びらしい形や萼らしい形は、それぞれの器官が作られる際の細胞分裂の位置決めによって決まっていることが判明した。数理シミュレーションによって、さまざまな可能性をしらみつぶしに検討することで、観察された要因の内どれが本質的に重要なのかを見極めることができた。

3）様々な生命現象に対する数理的研究

その他にも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。

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.

1）Origin of diverse phosphorylation patterns in the ERBB system

One group of receptors that receive signal molecules on the cell surface is the ERBB family, which consists of ERBB1, ERBB2, ERBB3, and ERBB4. When signal molecules bind to ERBB molecules, the four types of ERBBs form various dimers, and phosphorylation reactions within dimers occur which triggers a variety of responses of cells, like proliferation or differentiation. In humans, it is known that the composition of the amount of four types of ERBB in cells differs between different tissues, and it is thought that this creates different behaviors in signal transduction between tissues. However, it has been difficult to

experimentally measure the details of the binding and phosphorylation reactions of the four ERBBs, and it was not known how the diversity of responses to signals is generated.

By combining experimental measurements and mathematical modeling, we have identified the reaction properties of the four ERBBs and how they change in response to signals for the first time. In addition, through further mathematical analysis, we identified the reaction properties that play an essential role in the diversity of responses. First, we measured the phosphorylation responses of four ERBBs in seven cell types with different compositions of ERBBs and gave two different signals to each of them. Next, we developed a mathematical model that incorporates all possible binding reactions and all phosphorylation reactions between the four ERBB molecules. Then, by comparing with the experimental results, the rate constants of each binding reaction and phosphorylation reaction were determined. We investigated the effects of changing the rate constants in the mathematical model on the diversity of phosphorylation responses. As a result, it was found that the differences in the phosphorylation reaction rates among the four ERBB molecules has a great effect on the diversity of the response, and the difference in the binding reaction is not a major factor.

2）Origin of the different shapes between petal and sepal in plant organogenesis

It is generally considered that the shapes of plant organs are determined by the pattern of cell division that occurs during organogenesis. In collaboration with a group of plant embryologists, we investigated the origin of morphological differences between petals and sepals of Arabidopsis thaliana. Detailed analysis of the position and angle of cell division during organogenesis revealed that petals and sepals differ in both the position and angle of cell divisions. Then we analyzed them using mathematical models and numerical simulations. When we varied the position of cell division during petal and sepal formation, the final organ shape changed significantly. We identified conditions for the spatial distribution of division frequencies that produce petal-like and sepal-like shapes. On the other hand, varying the angle of cell division had only a limited effect on petal-like and sepal-like shapes. The results of this analysis indicate that petal-like and sepal-like shapes are determined by the position of cell division during the production of each organ. Mathematical simulations allowed us to examine the various possibilities and to determine which factors were essentially important.

3）Mathematical studies for biological phenomena

We studied some biological phenomena using mathematical modeling by collaborating experimental biologists.

List of Publications

Okada T., Miyagi H., Sako Y., Hiroshima M.* and Mochizuki A.*（2022）Origin of diverse phosphorylation patterns in the ERBB system. *Biophysical Journal* **121**, 470–480.

Mochizuki A.*（2022）A structural approach to understanding enzymatic regulation of chemical reaction

networks. *Biochem. J.* **479**（11）, 1265–1283.

Kinoshita A, Naito M., Wang Z., Inoue Y., Mochizuki A. and Tsukaya H.*（2022）Position of meristems and the angles of the cell division plane regulate the uniqueness of lateral organ shape. *Development* **149**（23）, dev199733.

Mochizuki A.（2023）Controlling complex dynamical systems based on the structure of the networks. *Biophysics and Physicobiology* **20**（2）, e200019.

Mori, F., and Okada, T.（2023）. Information-transfer characteristics in network motifs. *Physical Review Research* **5**（1）, 013037.

List of Presentations

Mochizuki, A. "*Biological function and functional module originated in structure of network.*"（Invited）, Workshop on Non-equilibrium Phenomena in Physics and Biology, Lahan Select Gyeongju, South Korea, December 5-9, 2022

Mochizuki, A. "*Understanding self-organizing pattern on plant cell wall by mathematical analyses*"（Invited）, From Cellular Dynamics to Morphology III, Online, November 22, 2022

Okada, T., Isacchini, G., Yu, Q., and Hallatschek, O. “Lineage frequency fluctuations reveal the spatial dynamics of disease transmission in SARS-CoV-2”, American Physics, Society March Meeting, March 10, 2023

望月敦史.「生命システムを数理で解く　－遺伝子と遺伝子の関係を理詰めで考えると ...。」. 第 16 回公開講演会『医生物学研究所の船出』, 京都大学百周年時計台記念館 1 階　百周年記念ホール , 2022 年 7 月 9 日

望月敦史. 招待講演「Controlling cell fate specification system based on network structure」. 第 60 回生物物理学会年会 ワークショップ「Topological approaches to understand behaviours of complex biological systems」, 函館アリーナ・函館市民会館 , 2022 年 9 月 28-30 日

岡田崇. 招待講演「Network architecture determines sensitivity of biochemical reaction systems」. 第 60 回生物物理学会年会 ワークショップ「Topological approaches to understand behaviours of complex biological systems」, 函館アリーナ・函館市民会館 , 2022 年 9 月 28-30 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」. 学術変革領域「細胞コミュニティ」キックオフミーティング , 大阪大学 , 2022 年 10 月 4 日

望月敦史. 招待講演「ネットワークから生まれる機能と機能単位」. ワークショップ「定量と定性の予測検証生物学」, 分子生物学会 2022 年度年会 , 2022 年 12 月 2 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 4 年目の本年度は、Shafiqul Islam さんが来日し博士研究を開始した。Raghda Khatab さんは医学研究科医科学専攻修士課程へ進学し修士研究を開始した。また、医学研究科血液・腫瘍内科学分野の日向瑞貴さんが当分野で博士研究を開始した。

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、2 本の論文発表することができた。1 本目は遊佐教授が英国 Sanger 研究所に在籍時からの共同研究で英国の製薬会社 AstraZeneca との研究である。乳がんは、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ヒト上皮成長因子受容体 HER2 の発現の有無を元に薬を用いた治療法が決められる。この 3 ついずれの発現もないトリプルネガティブ乳がんに対しては抗がん剤を使う治療法がとられるが、予後が悪い。近年、DNA 修復因子 *BRCA1/2* の遺伝子変異を有するトリプルネガティブ乳がんに対しては合成致死を誘導する PARP1 阻害剤を使うことができるようになり、分子標的薬が使われるようになった。乳がんは mTORC1 の活性化が細胞増殖に重要であり、この上流の因子の変異でシグナル経路が活性化している。特に *PTEN* 遺伝子欠損を有する乳がんは mTORC1 活性に依存的で、この二つの中間に位置する AKT 活性にも依存的である。このことに着目し AstraZeneca では AKT 阻害剤を開発し、臨床試験をおこなっている。本共同研究では、AKT 阻害剤の *PTEN* 欠損乳がん細胞での感受性に関わる因子の同定を CRISPR-KO スクリーニングを用いて行った。耐性を誘導する遺伝子は、AKT 阻害により抑制された mTORC1 を再活性化させるもので、例えば ATK と mTORC1 の間に位置する TSC1/2 である。TSC1/2 は mTORC1 を抑制する機能を持つが、遺伝子欠損することで上流のシグナルによらず mTORC1 の構成的活性化を引き起こし、AKT 阻害剤耐性となる。感受性を亢進させる因子としては複数の候補の中から阻害剤が利用できる遺伝子を選び、AKT 阻害剤との併用効果を検討した。結果、MCL1 阻害剤が AKT 阻害剤と顕著な併用

効果を示した。併用することで数時間以内に迅速なアポトーシスを誘導することがわかり、細胞株ゼノグラフトモデルや PDX を用いた *in vivo* 試験でもその薬効を確認することができた。この併用によりより効果の高い治療法の開発に貢献するものと考える。

2 本目の論文は、同じく遊佐教授が英国 Sanger 研究所に在籍していた時からの共同研究で英国エジンバラ大学 Keisuke Kaji 教授との研究である。Kaji 教授は iPS 細胞のリプログラミングの過程に起こる現象の解析を目指し、tet-on システムを用いた山中 4 因子発現による線維芽細胞リプログラミング系を構築した（Nature 2013）。本共同研究では Kaji 教授のリプログラミング系と CRIPSR-KO スクリーニングを組み合わせ、リプログラミングに関わる因子の同定を目指した。リプログラミング阻害に働いている遺伝子（KO することでリプログラミング自体は亢進）として、既知の *Trp53, Men1, Jun, Dot1l* 等が同定され、スクリーニングが機能していることが確認できた。新規の遺伝子として 16 遺伝子に関して表現型を確認することができた。このうち *Zfp266* に関して、詳細な分子機能解析を実施することとした。Zfp266 は N 末端側に KRAB ドメインを持ち遺伝子発現を抑制していると考えられる。全長 Zfp266 を線維芽細胞に過剰発現させるとリプログラミング効率は低下したが、KRAB ドメイン欠損あるいは変異型 KRAB ドメインを有する Zfp266 は効率に影響を与えなかったことから、KRAB ドメインの転写抑制機能がリプログラミングを抑制していると示唆された。この Zfp266 がゲノム上で結合している部位を DamID を用いて決定したところ、B1 SINE が見出された。クロマチンアクセシビリティを検出する ATAC-seq 解析を行なったところ、*Zfp266* KO 細胞では B1 SINE 配列を含むリプログラミング因子結合領域のアクセシビリティーが有意に上昇しており、また標的遺伝子の遺伝子発現も有意に上昇することから、このことがリプログラミング効率の亢進をもたらしていると考えられた。KRAB ドメインを CRISPR-a システム用に開発された融合転写活性化ドメインに置き換えた VPR-Zfp266 を作製しリプログラム因子と共導入した結果、リプログラム因子の標的遺伝子の発現を野生型細胞よりもより強く誘導することができ、結果としてリプログラミング効率を上昇させることに成功した。本研究では、Zinc finger タンパク質が細胞アイデンティティーの規定に重要な役割を担うことが明らかとなった。KRAB ドメインを持つ Zinc finger タンパク質は無数にあり、細胞分化に伴う細胞アイデンティティーの確立に関与している可能性も考えられる。更なる解析により細胞の運命操作をより効率的に行う方法の開発にもつながると考えられる。なお、スクリーニングからはリプログラミング必須遺伝子も複数同定されている。現在も解析を継続中であり、今後論文発表する予定である。

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 4 of our lab history, Mr. Shafiqul Islam managed to come to Japan after COVID pandemic and started his PhD work. Ms. Raghda Khatab started her Master work. Dr. Mizuki Hyuga, a haematologist, started her PhD work in our lab.

In this year, we achieved significant results in 2 international collaborative research projects using the CRISPR-KO screening method developed in our laboratory, and were able to publish two papers. The first paper is collaborative research with AstraZeneca, a pharmaceutical company in the UK, which was initiated when Professor Yusa worked at the Wellcome Sanger Institute. The treatment for breast cancer is determined based on the expression of estrogen receptors, progesterone receptors, and human epidermal growth factor receptor 2（HER2）. For triple-negative breast cancer, which lacks the expression of all three receptors, chemotherapy is used, but the prognosis is relatively poor. In recent years, a treatment effect has been observed for triple-negative breast cancer with genetic mutations in the DNA repair factors BRCA1/2 by using PARP1 inhibitors that induce synthetic lethality. The activation of mTORC1 is crucial for cell proliferation in breast cancer, and mutations in upstream factors result in the activation of mTORC1. In particular, breast cancer with *PTEN* gene deficiency depends on mTORC1 activity and also depends on AKT activity, which is located upstream of mTORC1 in the pathway. AstraZeneca has developed an AKT inhibitor and is conducting clinical trials by focusing on this aspect. In this collaborative research, we identified factors related to the sensitivity of *PTEN*-deficient breast cancer cells to the AKT inhibitor using CRISPR-KO screening. The genes that induce resistance are those that can reactivate mTORC1, such as TSC1/2, which is positioned between AKT and mTORC1. TSC1/2 negatively regulates mTORC1 and its deficiency leads to constitutive activation of mTORC1 independent of upstream signals, thereby resulting in resistance to AKT inhibitors. Among multiple candidate genes that enhance sensitivity, we selected genes for which inhibitors were available and evaluated their combined effect with the AKT inhibitor. As a result, a MCL1 inhibitor showed significant synergistic effects with the AKT inhibitor. It was found that the combination induced rapid apoptosis within a few hours, and the therapeutic efficacy was confirmed in cell-line xenograft models and a patient-derived xenografts（PDX）model. We believe that this combination therapy contributes to the development of a more effective treatment with improved prognosis.

The second paper is collaborative research with Professor Keisuke Kaji from the University of Edinburgh, UK. This collaboration was also initiated when Professor Yusa was at the Wellcome Sanger Institute. Professor Kaji aimed to analyze the phenomena occurring during the reprogramming of induced pluripotent stem cells（iPSCs）and constructed a fibroblast reprogramming system using the tet-on system with the expression of the Yamanaka factors（Nature 2013）. In this collaborative research, we combined Professor Kaji's reprogramming system with CRISPR-KO screening to identify factors involved in reprogramming. Genes that inhibit reprogramming（i.e. knocking them out enhances reprogramming）were identified, including known genes such as *Trp53*, *Men1*, *Jun*, and *Dot1l*, confirming the functionality of the screening.

We were able to validate 16 genes as novel factors. We decided to conduct detailed molecular functional analysis of one such factor, Zfp266. Zfp266 carries a KRAB domain at the N-terminal end, which inhibits gene expression. When full-length Zfp266 was overexpressed in fibroblasts, the reprogramming efficiency decreased. However, Zfp266 with a KRAB domain deletion or a mutant KRAB domain did not affect the efficiency, suggesting that the transcriptional repression function of the KRAB domain inhibits reprogramming. The binding sites of Zfp266 on the genome were determined using DamID, and B1 SINE sequences were identified. ATAC-seq analysis, which detects chromatin accessibility, showed a significant increase in the accessibility of reprogramming factor binding regions containing B1 SINE sequences in *Zfp266* KO cells. Additionally, the expression of target genes showed a significant increase, suggesting that this contributes to enhanced reprogramming efficiency. We created VPR-Zfp266, which replaced the KRAB domain with a fusion transcription activation domain, VPR, developed for the CRISPR-a system, and co-introduced it with the reprogramming factors. As a result, we successfully induced the expression of target genes of the reprogramming factors more strongly than in wild-type cells, leading to an increase in reprogramming efficiency. This study revealed the important role of zinc finger proteins in determining cell identity. There are countless zinc finger proteins with KRAB domains, and they may also be involved in establishing cell identity during cell differentiation. Further analysis may lead to the development of more efficient methods for manipulating cell fate. Multiple essential genes for reprogramming were also identified through the screening. We are currently continuing the analysis and plan to publish further papers in the future.

List of Publications

〈原著論文〉

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

Collier AJ, Bendall A, Fabian C, Malcolm AA, Tilgner K, Semprich CI, Wojdyla K, Nisi PS, Kishore K, Roamio Franklin VN, 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

Omatsu O, Aiba A, Maeta T, Higaki K, **Aoki K**, Watanabe H, Kondoh G, Nishimura R, Takeda S, Chung UI,

Nagasawa T. Runx1 and Runx2 inhibit fibrotic conversion of cellular niches for hematopoietic stem cells. **Nat. Commun.** 2022 May 12;13（1）:2654

Abe T, Horisawa Y, Kikuchi O, Ozawa-Umeta H, Kishimoto A, Katsuura Y, Imaizumi A, Hashimoto T, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, **Yusa K**, Asakura T, Kakeya H, Kanai M. Pharmacologic characterization of TBP1901, a prodrug form of aglycone curcumin, and CRISPR-Cas9 screen for therapeutic targets of aglycone curcumin. **Eur. J. Pharmacolo**. 2022 Nov15;935:175321

Dunn S, Eberlein C, Yu J, Gris-Oliver A, Ong SH, Yelland U, Cureton N, Staniszewska A, McEwen R, Fox M, Pilling J, Hopcroft P, Coker EA, Jaaks P, Garnett MJ, Isherwood B, Serra V, Davies BR, Barry ST, Lynch JT, **Yusa K**. AKT-mTORC1 reactivation is the dominant resistance driver for PI3K*β*/AKT inhibitors in PTEN-null breast cancer and can be overcome by combining with Mcl-1 inhibitors. **Oncogene** 2022 Nov; 41（46）;5046-5060

Kaemena DF, Yoshihara M, Beniazza M, Ashmore J, Zhao S, Bertenstam M, Olariu V, Katayama S, Okita K, Tomlinson SR, **Yusa K**, Kaji K. B1 SINE-binding ZFP266 impedes mouse iPSC generation through suppression of chromatin opening mediated by reprogramming factors. **Nat. Commun**. 2023 Jan 30;14（1）:488

Nakamura N, Wada F, Kondo T, **Aoki K**, Arai Y, Mizumoto C, Kanda J, Kitawaki T, Yamashita K, Takaori-Kondo A. Significance of Omitting Day 11 Mini-Dose Methotrexate for GVHD Prophylaxis After Unrelated Bone Marrow Transplantation. **Transplant. Cell. Ther.** 2023 Feb;29（2）:119.e1-119.e7.

List of presentations

〈招待講演〉

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　東京（オンライン）　2022 年 3 月 19 日

遊佐宏介　ヒト ES/iPS 細胞に蓄積される変異　第一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　京都（オンライン）　2022 年 3 月 9 日

遊佐宏介　大規模 CRISPR 遺伝子スクリーニングによる 創薬標的の探索と検証　理化学研究所 DMP 創薬セミナー　埼玉（オンライン）　2022 年 4 月 25 日

Kosuke Yusa　Development and Applications of CRISPR-KO Screening　第 31 会日本がん転移学会学術集会・総会　京都　2022 年 7 月 7 日

Kosuke Yusa　Development of CRISPR-KO Screening and its Applications in Cancer Research International Academy for Advanced Oncology　東京（オンライン）　2022 年 7 月 29 日

遊佐宏介　CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用　第 45 回日本分子生物学会年会　横浜　2022 年 11 月 30 日

〈**一般演題**〉

樽本 雄介 , 杉野 成一 , 遊佐 宏介　CRISPR を用いた多能性幹細胞における遺伝子発現ネットワークの解析　日本ゲノム編集学会第 7 回大会　京都（オンライン）　2022 年 6 月 7 日

青木一成　Identification of factors essential for CXCR4 signaling in leukemic cells using CRISPR dropout screens　第 17 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム　金沢　2022 年 10 月 14 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 & Therapeutics

教　授	伊藤　貴浩	Prof.	Takahiro Ito
准教授	服部　鮎奈	Associate 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 3 年目を迎えた 2022 年には、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 3 名、また医学部・医学研究科から 4 回生 1 名、修士課程大学院生 2 名、博士課程大学院生 1 名を受入れ、研究教育指導を開始した。

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ていること、BCAT1機能阻害によってその増殖が阻害されることを発見した。現在、BCAA依存性のがん幹細胞維持の分子機構の解明に取り組んでいる。これらの研究を通じて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。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を多く持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の条件検討を完了した。今後は、これらの知見を元に修飾酵素の同定を目指し、Msi2活性化経路を明らかにする。また、Msi2以外にも白血病幹細胞の維持に寄与するRNA結合タンパク質を複数同定した。これらの因子についても幹細胞維持の分子機構の解明を進めている。

乳がんにおける細胞内代謝によるがん細胞悪性化制御機構

乳がんは女性が罹患するがんの中では最も頻度が高く、罹患率、死亡率共に増加傾向にある。研究の進展により、乳がんは遺伝子発現パターンによっていくつかのサブタイプに分類されることが分かっている。乳がん細胞が発現する受容体を標的としたホルモン療法と抗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。

脳－骨髄臓器連関から迫る骨髄微小環境の制御と白血病病態解明

白血病は、造血幹細胞・前駆細胞に生じた遺伝子異常に起因する血液がんの一種である。特定の遺伝子変異を持つサブタイプでは分子標的療法の開発等により予後は改善しているものの、多くの場合再発や治療抵抗性の問題があり、5 年相対生存率は 44% 程度に留まっているのが現状である。悪性化や骨髄微小環境内のがん幹細胞維持機構の未解明がひとつの原因と考えられる。この課題解決のため本研究は、骨髄に存在する神経支配に着目し、本機構を考える上で基礎となる造血システムに神経システムを追加した骨髄微小環境制御モデルを新たに提案する。このモデルを骨髄性白血病病態解明にも適用し、造血と神経システムの体系的な解析を実施することで、脳－骨髄臓器連関から生み出される白血病病態や骨髄微小環境制御機構の解明に挑む。本年度は、骨髄へ投射する神経支配および脳の神経活動を標的とした組織学的解析の条件検討を進めた。確立した条件を白血病マウスに適応し、病態モデルマウスにおける骨髄への神経支配および脳の神経活動の動態を検出することに成功した。本年度は再現性を確認するとともに、各種神経マーカーを標的としたマウスラインを用い、骨髄および脳のイメージングを実施する。加えて、白血病モデルマウスにおける骨髄の動態を、分子レベルで解析する。

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. In this year, we have optimized the conditions for the purification of the Msi2 modification factor. After its identification, we will examine its expression and functions in leukemia stem cells. We have also identified a novel RNA binding protein which regulates leukemia stem cells and will analyze its functions.

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.

Defining contribution of neural system in leukemia

Leukemia is hematologic malignancy initiated by recurrent genetic alterations. Although the prognosis of subtypes with specific gene mutations has improved with the development of molecular targeted therapy, the 5-year relative survival rate of leukemia remains at around 44% because of the treatment resistance. Elucidation of the disease stage transition mechanism and cancer stem cell maintenance mechanism in the bone marrow microenvironment is also important in terms of treatment method development. This study focuses on the neural system in the bone marrow and proposes a model of bone marrow microenvironment regulation that adds the neural system to the hematopoietic system, which is fundamental to this mechanism. By applying this model to leukemia pathophysiology and conducting a systematic analysis of hematopoietic and neural systems, we will elucidate the leukemia pathophysiology and the control mechanism of mone marrow microenvironment produced by the brain-bone marrow networks. This year, we proceeded to examine the conditions for histological analysis targeting innervation to the bone marrow and neural activity in the brain. We applied the established conditions to leukemia mice and succeeded in detecting the dynamics of neuronal projections to the bone marrow and neuronal activity in the brain in the leukemia mice. This year, we will confirm reproducibility and conduct bone marrow and brain imaging using mouse lines targeting various neuronal markers. In addition, we will analyze the dynamics of bone marrow in the leukemia mouse model at the molecular level.

List of Publications

Hattori A*, Takamatsu-Ichihara E, Yamamoto Y, Fujita S, Yamagata K, Katsumoto T, Machida Y, Shinohara H, Murakami R, and Kitabayashi I*, Genetic and chemical targeting of the ATPase complex TIP48 and 49 impairs acute myeloid leukemia. ***Leukemia***, in press, 2023,（* Corresponding author）

Jimbo K, Hattori A, Koide S, Ito T, Sasaki K, Iwai K et al. Genetic deletion and pharmacologic inhibition of E3 ubiquitin ligase HOIP impairs the propagation of myeloid leukemia. ***Leukemia*** 37:122-133（2022）.

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. ***Leukemia*** 36:1550-62（2022）.

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. ***J Bone Oncol*** *34*, 100430（2022）

伊藤貴浩「生体調節の立役者：分岐鎖アミノ酸」**実験医学** 40: 2216-2221（2022）

Presentations

Yamamoto Y, Nakagawa M, Glushka J, Edison AE, Nakatani F, Ito T and Hattori A. Mechanism of chondrosarcoma propagation via amino acid metabolic reprogramming. The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Poster presentation. Dec, 2022

Nakano T, Hattori A and Ito T, Mutant IDH interferes with BCAA metabolism and suppresses leukemic growth. The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Poster presentation. Dec, 2022

Matsuura K, Kuroda I, Nakano T, Yamamoto M, Inoue J, Glushka J, Edison AS, Imamura H, Hattori A, and Ito T. Branched-chain amino acid metabolism regulates triple negative breast cancer growth by BCAT1 upregulation. The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Poster presentation and Science pitch talk. Dec, 2022

Hattori A, Amino acid metabolism regulates cancer propagation, The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Poster presentation. Invited Talk. Nov, 2022

Nakano T, Hattori A, Ito T, Mutant IDH interferes with BCAA metabolism and suppresses leukemic growth. The 1st Workshop of the Moonshot Goal 2. Poster presentation. Nov, 2022

Yamamoto Y, Nakagawa M, Glushka J, Edison AS, Nakatani F, Ito T, Hattori A, Malignant Transformation in Chondrosarcoma via activated BCAA Metabolism. The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Selected Talk and Poste presentation, Oct, 2022

Yamamoto Y, Nakagawa M, Glushka J, Edison AE, Nakatani F, Ito T and Hattori A. Malignant Transformation in chondrosarcoma via Amino Acid Metabolic Reprogramming. The 8th Cancer Metabolism Meeting, Poster presentation, July, 2022

Matsuura K, Nakano T, Kuroda I, Yamamoto M, Inoue J, Glushka J, Edison AS, Imamura H, Hattori A, and Ito T. Triple negative breast cancer regulation by branched-chain amino acids. The 8th Cancer Metabolism Meeting, Poster presentation, July, 2022

Ito T. *Metabolic regulation of cell fates in cancer.* The 7th Workshop on metabolic diseases, nutrition and

cancer, virtual meeting, Invited talk. Mar, 2023.

Ito T. *Regulation of stem cells in myeloid leukemia: a metabolic perspective.* The 17th International Symposium of the Institute Network, Kanazawa University, Invited talk. Oct, 2022.

Ito T. *Metabolic regulation of stem cell fates in cancer.* Medical & Life Science Seminar, The International Research Center for Medical Sciences（IRCMS）, Kumamoto University, Invited talk. Jun, 2022.

Ito T. *How to start a lab twice.* International Society of Experimental Hematology Junior PI Webinar Series: Journey & Lessons Learned, virtual meeting, Invited talk. Jun, 2022.

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

幹細胞デコンストラクション分野
Laboratory of Deconstruction of Stem Cells

教　授　　今吉　　格　　Prof.　　Itaru Imayoshi

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

1）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。本年度は、PA-Gal4/UAS システムについて、大幅に機能向上させることに成功し、論文報告をおこなった（Nagasaki et al., 2023）。この光遺伝学的ツール（eGAV）を使用することで、神経幹細胞を含む幹細胞において、自己複製や分化運命決定を制御する転写因子の発現を人工的にコントロールすることが可能になった。光を用いた遺伝子発現制御ツールにおいては、既存の遺伝子発現制御技術に比べて、より優れた時間的解像度にて操作が可能であり、これまで実験的に検証が困難であったような、遺伝子発現の振動などがもつ機能的に意義について、実験的に検証する

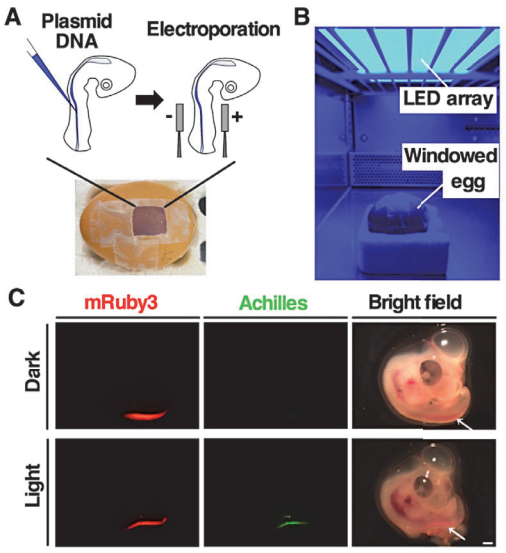


Fig. 1. Optical regulation of gene expressions by photo-activatable transcription factors in chick embryos.

ことが可能になる。加えて、神経幹細胞を光でコントロールするという、新しい再生医療技術の開発につながると期待される。

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）。本年度は、新たに開発した PA-Tet-ON/OFF システムを用いて、遺伝子発現の振動発現と蓄積発現の違いが、細胞表現型に差異を与える分子メカニズムについて解析を行っている。

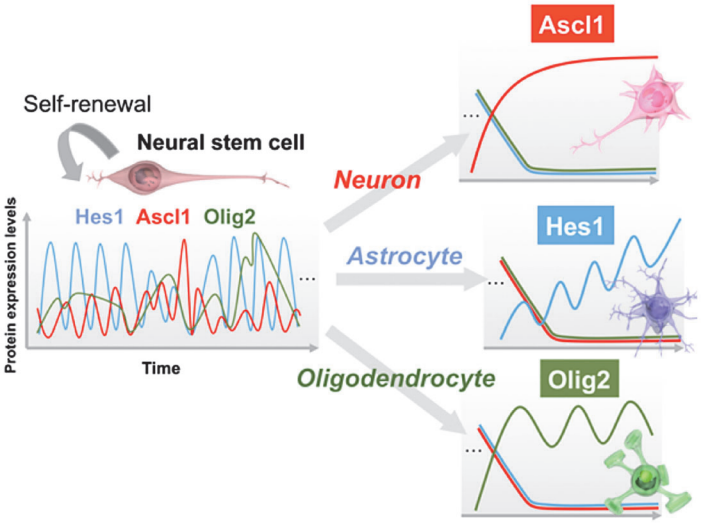


Fig. 2. Oscillatory v.s. sustained expressions of bHLH transcription factors regulate neural stem cells

We aim to understand the cellular and molecular mechanism of the cell proliferation, maintenance 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 light-mediated 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. In this school year, we have reported a highly improved PA-Gal4/UAS system. These systems offer optogenetic tools for the precise manipulation of gene expression at fine spatiotemporal resolution in mammalian cells（Fig. 1）.

2）Regulatory mechanism of neural stem cells

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

List of Publications

Tachiki, Y., Suzuki, Y., III., Kurahashi M., Ohki, K., Mavuk, O., Nakagawa, T., Ishihara, S., Gyoten, Y., Yamamoto, A., and Imayoshi, I.（2023）. Scale space calibrates present and subsequent spatial learning in Barnes maze in mice. **Eneuro.** 10（6）.

Nagasaki, S., C., Fukuda, T., D., Yamada, M., Suzuki, Y., III., Kakutani R., Guy, A., T., and Imayoshi., I.（2023）. Enhancement of Vivid-based Photo-Activatable Gal4 Transcription Factor in Mammalian Cells. **Cell Struct Funct.** 48: 31–47.

Hayashi, M., Gullo, M., Senturk, G., Di Costanzo, S., Nagasaki, S., C., Kageyama, R., Imayoshi, I., Goulding, M., Pfaff, S., L., Gatto, G.（2023）. A spinal synergy of excitatory and inhibitory neurons coordinates ipsilateral body movements. **bioRxiv.** 2023.03.21.533603.

Oishi, M., Passlick, S., Yamazaki, Y., Unekawa, M., Adachi, R., Yamada, M., Imayoshi, I., Abe, Y., Steinhäuser, C. and Tanaka, K., F.（2022）. Separate optogenetic manipulation of Nerve/glial antigen 2（NG2）glia and mural cells using the NG2 promoter. **Glia.**

Kaise, T., Fukui, M., Sueda, R., Piao, W., Yamada, M., Kobayashi, T., Imayoshi, I., and Kageyama, R.（2022）. Functional rejuvenation of aged neural stem cells by Plagl2 and anti-Dyrk1a activity. **Genes Dev.** 36（1-2）:23.

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**
特定助教	**竹内　文彦**	**Project Assist. Prof.**	**Fumihiko Takeuchi**

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（Zuo et al.）
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（Saikruang et al.）
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
4）B 型肝炎ウイルスの増殖機構の解析（Suehiro et al.）
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（Ohto et a., Lee et al., Emralino et al.）
7）植物由来の抗ウイルス物質の探索（Kimura et al.）

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（Zuo et al.）
2）Study on the mechanism of sensing viral RNA by innate immune sensors（Saikruang et al.）
3）Use of rice bran derived double-stranded RNA for prophylactic and therapeutic purposes against viral infections
4）Study on the mechanism of hepatitis B virus（Suehiro et al.）
5）Screening of anti hepatitis B virus chemicals by using cccDNA inhibition assay
6）Study on autoimmunity caused by dysfunction of viral RNA sensors（Ohto et a., Lee et al., Emralino et al.）
7）Screening of plant-derived material for antiviral activity（Kimura et al.）

List of Publications

Ohto, T., Abu Tayeh, A., Nishikomori, R., Abe, H., Hashimoto, K., Baba, S., Arias-Loza, A-P., Soda, N.,

Satoh, S., Matsuda, M., Iizuka, Y., Kondo, T., Koseki, H., Yan, N., Higuchi, T., Fujita, T., Kato, H.（2022）. Intracellular virus sensor MDA5 mutation develops autoimmune myocarditis and nephritis. **Journal of Autoimmunity** 2022 Feb;127:102794. doi: 10.1016/j.jaut.2022.102794. Epub 2022 Feb 12.

Kimura, C., Oh, S-W., Fujita, T., Watanabe, T.（2022）. Adsorptive Inhibition of Enveloped Viruses and Nonenveloped Cardioviruses by Antiviral Lignin Produced from Sugarcane Bagasse via Microwave Glycerolysis. **Biomacromolecules** *23*, 789-797. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01209

Saikruang, W., Yan Ping, L. A., Abe, H., Kasumba, D. M., Kato, H., Fujita, T.（2022）. The RNA helicase DDX3 promotes IFNB transcription via enhancing IRF-3/p300 holocomplex binding to the IFNB promoter. **Scientific Reports** 12:3967 | https://doi.org/10.1038/s41598-022-07876-z

Lee, S., Hirota, K., Schuette, V., Fujita, T., Kato, H.（2022）. Attenuation of regulatory T cell function by type I IFN signaling in an MDA5 gain-of-function mutant mouse model. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** *12*, 171-175. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.09.017. Epub 2022 Sep 7.

Emralino, F. L., Satoh, S., Sakai, N., Takami, M., Takeuchi, F., Yan, N., Rutsch, F., Fujita, T., Kato, H.（2022）. Double-Stranded RNA Induces Mortality in an MDA5-Mediated Type I Interferonopathy Model. **J. Immunol.** *209*, 2093-2103. doi: 10.4049/jimmunol.2200367.

Zuo, W., Wakimoto, M., Kozaiwa, N., Shirasaka, Y., Oh, S-W., Fujiwara, S., Miyachi, H., Kogure, A., Kato, H., Fujita, T.（2022）. PKR and TLR3 trigger distinct signals that coordinate the induction of antiviral apoptosis. **Cell Death and Disease** 13:707 ; https://doi.org/10.1038/s41419-022-05101-3

Suehiro, Y., Tsuge, M., Kurihara, M., Uchida, T., Fujino, H., Ono, A., Yamauchi, M., Naswa Makokha, G., Nakahara, T., Murakami, E., Abe-Chayama, H., Kawaoka, T., Miki, D., Imamura, M., Aikata, H., Nelson Hayes, C., Fujita, T., Chayama, K.（2022）. Hepatitis B Virus（HBV）Upregulates TRAIL-R3 Expression in Hepatocytes Resulting in Escape From Both Cell Apoptosis and Suppression of HBV Replication by TRAIL. **J. Infect. Dis.** *227*, 686-695. doi: 10.1093/infdis/jiac044.

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

2022 年 3 月に徐可婧が人間・環境学研究科修士課程を修了した。韓国在住のままリモートで人間･環境学研究科修士課程に復学していた趙庚鶴が、2022 年 4 月に来日した。大使館推薦の国費留学生の Sandra Morales Ruiz が、2022 年 4 月に研究生となった。共同研究者の志田壽利博士が 2022 年 7 月に研究員として加わった。2023 年 3 月に王梓涵が、人間・環境学研究科修士課程を修了し、2023 年 4 月に同博士課程に進学した。国費留学研究生の Sandra Morales Ruiz が 2023 年 4 月に人間・環境学研究科博士課程に入学した。

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）。2022 年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

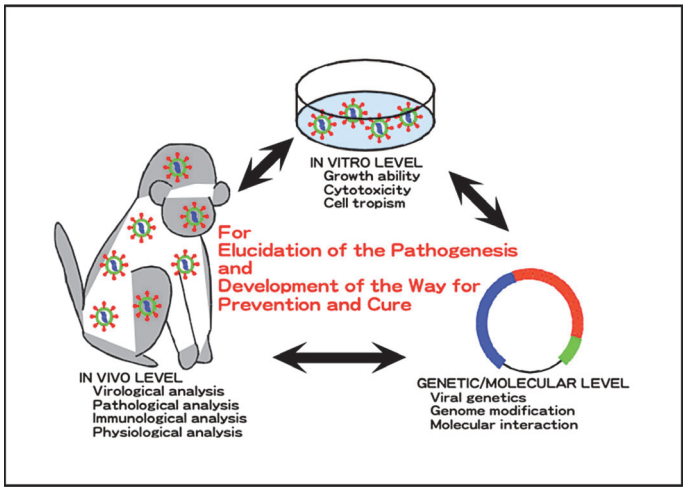


Fig.1. Research cycle of primate model for infectious diseases

サルに適応した CCR5 指向性コンセンサスクローン SHIV-MK38C の CD4 mimic に対する感受性

サルで AIDS 様症状を示す SIV を基本に HIV-1 の env を発現するキメラウイルスである SHIV が作製されてきた。しかしコレセプターの指向性が CXCR4 の SHIV と CCR5 の HIV-1 では感染する細胞や病態に違いが生じる。また HIV-1 は tier 2 の中和耐性であるが SHIV の多くは tier 1 の中和感受性に属する。以前に我々は CCR5 指向性 tier 1 の SHIV-MK1 をサルに順化させて高い複製能力を持つ CCR5 指向性 tier 2 の SHIV-MK38 を開発したが、そのウイルスストックは遺伝的多様性を持つ。そこで実験の再現性を高めるために均一なゲノム集団である感染性分子クローンが必要とされた。SHIV-MK38 のコンセンサス変異を特定し SHIV-MK38C を作製した。次にその性質を評価しサルに接種した。またフルゲノム SHIV とシュードタイプウイルス（ps）を用いた env の詳細な解析を行った。SHIV-MK38C は CCR5 指向性で複製能力も高く、サルでの持続感染率は 2/3 であった。一方で SHIV-MK38C は中和耐性の責任変異 N169D を欠いていたため、psMK38C は tier 1C であり

psMK38C に N169D を加えた psMK38CD は tier 2 であることが示された。さらに psMK38CD に対して psMK38C は CD4 mimic（TKB002）による中和増強効果が見られた（Fig. 2）。同様の検証のため SHIV-MK38CD の作製を試みたが cell-to-cell 感染で維持できた N169D は cell-free 感染においては N169 へと復帰していた。また感染サル体内において N169D は 17 週以上経過後に検出された。SHIV-MK38C は SHIV-MK38 と同等の複製能力を持つが中和耐性と持続感染率については改善が必要である。そのためには N169D が必要と考えられるが、SHIV-MK38CD は in vitro では不安定で複製能が低い。しかし N169D がサル体内で獲得されたことは SHIV-MK38CD が複製能を高める変異を獲得した可能性を示唆する。一方で psMK38C が CD4 mimic に対して感受性であったことは SHIV-MK38C がその中和増強効果をサルモデルで検証するチャレンジウイルスとして有用である。

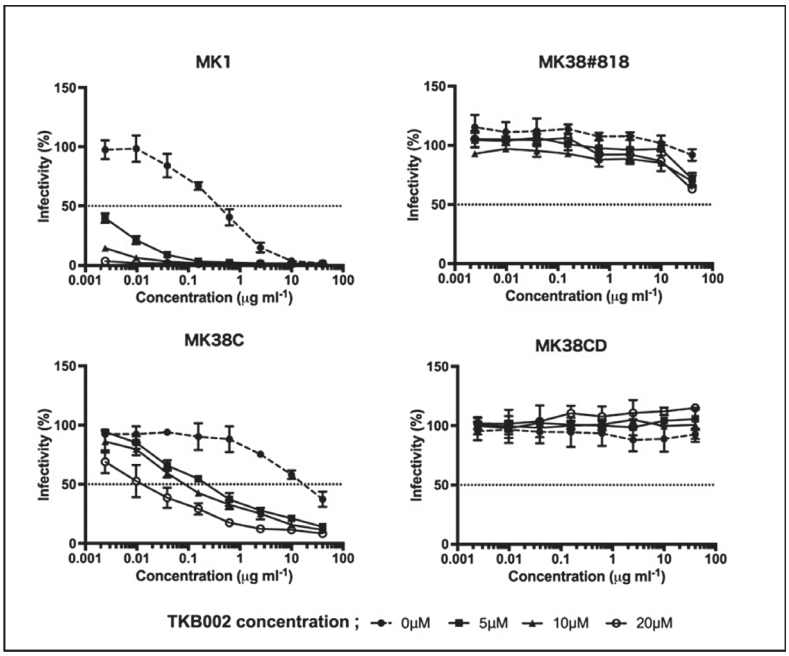


Fig.2 Enhancement of neutralization with CD4 mimic（TKB002）

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 2022 will be described below.

Susceptibility of monkey-adapted CCR5-tropic consensus clone SHIV-MK38C to CD4 mimic

SHIV, a chimeric virus that expresses HIV-1 *env*, has been constructed based on SIV, which shows AIDS-like symptoms in monkeys. However, the co-receptor tropism of its CXCR4 SHIV and CCR5 HIV-1 causes differences in infected cells and pathology. HIV-1 is tier 2 neutralization-resistant, but most of SHIV belongs to tier 1 neutralization-susceptibility. We previously adapted CCR5-tropic tier 1 SHIV-MK1 to monkeys to develop highly replicative CCR5-tropic tier 2 SHIV-MK38, whose virus stocks are genetically diverse. In order to improve the reproducibility of experiments, therefore, an infectious molecular clone, which is a homogeneous genomic population, was required. A consensus mutation of SHIV-MK38 was identified to generate SHIV-MK38C. Then its properties were evaluated and inoculated into monkeys. We also performed detailed analysis of *env* using full-genome SHIV and pseudotyped virus（ps）. SHIV-MK38C is CCR5-tropic and has high replication capacity, and the persistent infection rate in monkeys was 2/3. On the other hand,

SHIV-MK38C lacked the mutation responsible for neutralization resistance, N169D, indicating that psMK38C is tier 1C and psMK38CD, which is psMK38C plus N169D, is tier 2. Furthermore, psMK38C showed a neutralization enhancement effect by CD4 mimic（TKB002）against psMK38CD（Fig. 2）. For similar verification, we tried to produce SHIV-MK38CD, but N169D that could be maintained in cell-to-cell infection reverted to N169 in cell-free infection. N169D was detected in infected monkeys more than 17 weeks later. Although SHIV-MK38C has the same replication ability as SHIV-MK38, improvement of neutralization resistance and persistent infection rate is necessary. N169D may be required for this, but SHIV-MK38CD is unstable and replication-poor *in vitro*. However, the acquisition of N169D in monkeys suggests that SHIV-MK38CD may have acquired a replication-enhancing mutation. On the other hand, the sensitivity of psMK38C to CD4 mimic suggests that SHIV-MK38C is useful as a challenge virus to verify its neutralization-enhancing effect in a monkey model.

List of Publications

Ishii, H., Terahara, K., Nomura, T., Okazaki, M., Yamamoto, H., Shu, T., Sakawaki, H., Miura, T., Watkins, D. I., and Matano, T.（2022）. Env-independent protection of intrarectal SIV challenge by vaccine induction of Gag/Vif-specific CD8（+） T cells but not CD4（+） T cells. **Mol. Ther.**, *30*, 2048-2057.

Ode, H., Saito, A., Washizaki, A, Seki, Y., Yoshida, T., Harada, S., Ishii, H., Shioda, T., Yasutomi, Y., Matano, T., Miura, T., Akari, H., H., and Iwatani, Y.（2022）. Development of Novel Macaque-Tropic HIV-1 Adapted to Cynomolgus Macaques. **J. Gen. Virol.**, *103*, 001790.

Matsuura, K., Yamaura, M., Sakawaki, H., Himeno, A., Pisil, Y., Kobayakawa, T., Tsuji, K., Tamamura, H., Matsushita, S., and Miura, T.（2023）. Sensitivity to a CD4 mimic of a consensus clone of monkey-adapted CCR5-tropic SHIV-MK38C. **Virology** *578*, 171-179.

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「病原体」として発見され、長年研究されてきた。しかし、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。我々は内在性レトロウイルスの新規機能解明を目指している。

1）レトロウイルス逆転写酵素に由来する単弓類特異的保存型推定タンパク質

我々は、カモノハシとハリモグラのゲノムから内在性レトロウイルス（ERV）由来遺伝子の可能性を網羅的に探索し、GRIP2 イントロンにクラスターを形成する 3 つの逆転写酵素様遺伝子 RTOM1、RTOM2、RTOM3 を同定した。比較ゲノム解析の結果、RTOM1、RTOM2、RTOM3 は強く保存されており、これらの種間で純化淘汰を受けていることが明らかになった。これらはカモノハシとハリモグラが分岐する前にタンデム重複によって生じた可能性がある。すべての RTOM 転写産物は精巣で特異的に発現しており、おそらく生理学的に重要であることを示唆している。本研究は、ERV に由来する単孔類特異的な *de novo* 遺伝子候補を報告した最初の研究であり、単孔類のユニークな進化に関する新たな知見を提供するものである。

2）新世界ザルにおけるシンシチン -2（syncytin-2）の融合活性低下の可能性

syncytin-2 は胎盤の発生に関与する膜融合タンパク質であり、新世界ザルと旧世界ザル（OWM）の共通の祖先系統で獲得された ERV のエンベロープ遺伝子に由来する。しかし、コモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）の syncytin-2 は、ヒト細胞株においてヒトや OWM の syncytin-2 よりも低い融合活性を示すことが知られている。霊長類における syncytin-2 遺伝子の機能的多様性を知るために、我々は新世界サル（NWM）の syncytin-2 遺伝子を調べた。ヒト、コモンマーモセット（*C. jacchus*）、フサオマキザル（*Sapajus apella*）における syncytin-2 遺伝子の細胞融合能を実験的に評価した。その結果、*S. apella* の細胞融合能はヒトの syncytin-2 よりも低いことがわかった。キメラ syncytin-2 組換え体の作製により、*S. apella* の syncytin-2 の表面サブユニットのアミノ酸の違いが、弱い細胞融合活性の原因であることが明らかになった。さらに、syncytin-2 のゲノム配列を解析した結果、syncytin-2 のオープンリーディングフレーム（ORF）は 7 種の類人猿と 22 種の OWM で高度に保存されていたが、12 種の NWM のうち 3 種の syncytin-2 の ORF は切断されていた。我々の結果は、いくつかの NWM の syncytin-2 は OWM や類人猿よりも重要性が低く、他の syncytin 様遺伝子が様々な NWM 種の胎盤形成に必要である可能性を示唆している。

3）内在性レトロウイルスの不活化によるワクチン製造用細胞の樹立

ほとんどの ERV は不活性化されているが、宿主細胞から複製可能なウイルスとして産生されるものもある。我々は以前、ネコ腎由来の株化細胞である Crandell-Rees feline kidney（CRFK）細胞を用いて調製した伴侶動物用弱毒生ワクチン数種に、RD-114 ウイルスと呼ばれる複製能をもつネコ ERV が混入していたことを報告した。また、感染性 RD-114 ウイルスは、CRFK 細胞内で複数の RD-114 ウイルス関連プロウイルス（RDRS）間の組換えによって生成されることも見出した。本研究では、ゲノム編集ツールである TAL エフェクター・ヌクレアーゼ（TALEN）を用いて RDRS の *env* 遺伝子をノックアウトし、ワクチン製品に感染性 ERV が混入するリスクを低減させた。その結果、感染性 RD-114 ウイルスを産生しない RDRS ノックアウト CRFK 細胞（RDKO_CRFK 細胞）の樹立に成功した。RDKO_CRFK 細胞におけるネコヘルペスウイルス 1 型、ネコカリシウイルス、ネコ汎白血球減少症ウイルスの増殖動態は親細胞と異なるが、いずれも 10^7 $TCID_{50}$/mL を超える高力価を示した。感染性 RD-114 ウイルスは RDKO_CRFK 細胞で増殖させたウイルスからは検出されなかった。本研究から、RDRS ノックアウト CRFK 細胞は、感染性 ERV の混入の危険性のない、弱毒生ワクチンや生物学的製剤の製造のための細胞株として有用であることが示唆された。

Viruses were discovered as "pathogens" and have been studied for many years. However, it has become clear that some viruses can "internalize" by entering the genome of the host germline cells, and that internalized viruses can provide the host with new functions. We aim to elucidate the functions of endogenous retroviruses.

1）Monotreme-specific conserved putative proteins derived from retroviral reverse transcriptase

We conducted a comprehensive search for possible endogenous retrovirus（ERV）-derived genes in platypus and echidna genomes and identified three reverse transcriptase-like genes named RTOM1, RTOM2, and RTOM3 clustered in the GRIP2 intron. Comparative genomic analyses revealed that RTOM1, RTOM2, and RTOM3 are strongly conserved and are under purifying selection between these species. These could be generated by tandem duplications before the divergence of platypus and echidna. All RTOM transcripts were specifically expressed in the testis, possibly suggesting their physiological importance. This is the first study reporting monotreme-specific de novo gene candidates derived from ERVs, which provides new insights into the unique evolution of monotremes.

2）Potentially reduced fusogenicity of syncytin-2 in New World monkeys

Syncytin-2 is a membrane fusion protein involved in placenta development that is derived from the endogenous retrovirus envelope gene acquired in the common ancestral lineage of New World and Old World monkeys（OWMs）. It is known that syncytin-2 is conserved between apes and OWMs, suggesting its functional importance; however, syncytin-2 of common marmosets（*Callithrix jacchus*）exhibits lower fusogenic activity than those of humans and OWMs in human cell lines. To obtain insight into the functional

diversity of syncytin-2 genes in primates, we examined the syncytin-2 gene in New World monkeys（NWMs）. We experimentally evaluated the cell fusion ability of syncytin-2 in humans, *C. jacchus*, and tufted capuchins（*Sapajus apella*）. We found that the cell fusion ability of *S. apella* was lower than that of human syncytin-2. Chimeric syncytin-2 constructs revealed that the amino acid differences in the surface unit of *S. apella* syncytin-2 were responsible for the weak cell fusion activity. In addition, genomic sequence analyses of syncytin-2 revealed that the open reading frames（ORFs）of syncytin-2 were highly conserved in seven apes and 22 OWMs; however, the syncytin-2 ORFs of three of 12 NWM species were truncated. Our results suggest that syncytin-2 in several NWMs may be of less importance than in OWMs and apes, and other syncytin-like genes may be required for placental development in various NWM species.

3）Establishment of CRFK cells for vaccine production by inactivating endogenous retrovirus with TALEN technology

We previously reported that several live-attenuated vaccines for companion animals prepared using the Crandell-Rees feline kidney（CRFK）cell line were contaminated with a replication-competent feline ERV termed RD-114 virus. We also found that the infectious RD-114 virus can be generated by recombination between multiple RD-114 virus-related proviruses（RDRSs）in CRFK cells. In this study, we knocked out RDRS env genes using the genome-editing tool TAL Effector Nuclease（TALEN）to reduce the risk of contamination by infectious ERVs in vaccine products. As a result, we succeeded in establishing RDRS knockout CRFK cells（RDKO_CRFK cells）that do not produce infectious RD-114 virus. The growth kinetics of feline herpesvirus type 1, calicivirus, and panleukopenia virus in RDKO_CRFK cells differed from those in parental cells, but all of them showed high titers exceeding 10^7 $TCID_{50}$/mL. Infectious RD-114 virus was undetectable in the viral stocks propagated in RDKO_CRFK cells.

List of Publications

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.（*corresponding author）

Kitao, K., Miyazawa, T.*, Nakagawa, S.*.（2022）. Monotreme-specific conserved putative proteins derived from retroviral reverse transcriptase. **Virus Evol.** *8（2）*: veac084.（*corresponding authors）

Shimode, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Miyazawa, T.*（2022）. Establishment of CRFK cells for vaccine production by inactivating endogenous retrovirus with TALEN technology. **Sci. Rep.** *12（1）*, 6641.（*corresponding author）

Shoji. H., Kitao, K., Miyazawa, T.*, Nakagawa, S.*（2023）. Potentially reduced fusogenicity of syncytin-2 in New World monkeys. **FEBS Open Bio.** *13（3）*, 459-467.（*corresponding authors）

Shoji, H., Tsukasa, Y., Kitao, K., Miyazawa, T.*（2023）. Characterization of ferret Pit1 as a receptor of feline

leukemia virus subgroup B. **J. Vet. Med. Sci.** *85（3）*, 326-328.（*corresponding author）

宮沢孝幸、鳥集徹　コロナワクチン失敗の本質（宝島社新書）（宝島社）

宮沢孝幸　ウイルス学者の絶望（宝島社新書）（宝島社）

宮沢孝幸　ウイルス学者の責任（PHP 新書）（PHP 研究所）

宮沢孝幸　なぜ私たちは存在するのか　ウイルスがつなぐ生物の世界（PHP 新書）（PHP 研究所）

List of Presentations

Koichi Kitao, So Nakagawa, Takayuki Miyazawa Finding of co-opted retroviral genes from reverse transcriptase in egg-laying mammals. Cold Spring Harbor Laboratory Transposable Elements Meeting 2022　2022 年 10 月 11-15 日

Koichi Kitao, Hiyori Shoji, So Nakagawa, Takayuki Miyazawa Endogenous retroviruses in egg-laying mammals and the fusogenic property of an envelope protein in echidna. 6th Uppsala Transposon Symposium　2022 年 10 月 26 日 -28 日

北尾晃一、早川卓志、宮沢孝幸、中川草 「単孔類ハリモグラのゲノムにみられるレトロウイルスの活発な内在化」第 24 回日本進化学会、沼津、2022 年 8 月 5-7 日

北尾晃一、宮沢孝幸、中川草　Open reading frame が保存された LINE レトロトランスポゾン座位の同定第 94 回日本遺伝学会、札幌、2022 年 9 月 14-17 日

庄司日和、北尾晃一、宮沢孝幸、中川草　新世界ザルで明らかになった syncytin 遺伝子の機能多様性とウイルス由来遺伝子の進化モデルの構築　第 94 回日本遺伝学会、札幌、2022 年 9 月 14-17 日

北尾晃一、庄司日和、宮沢孝幸、中川草　卵生哺乳類ゲノムに内在化したレトロウイルス由来のエンベロープタンパク質の細胞融合活性　第 45 回日本分子生物学会年会、千葉、2022 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

田中淳、北尾晃一、坂口翔一、宮沢孝幸　SARS-CoV-2 持続感染細胞におけるウイルスおよび宿主遺伝子発現動態の解析　第 69 回日本ウイルス学会学術集会、長崎、2022 年 11 月 13-15 日

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

マウス作製支援チーム
Reproductive Engineering team

技術専門員　宮地　　均　Senior Technical Specialist　Hitoshi Miyachi
技術専門職員　北野さつき　Technical Specialist　Satsuki Kitano

マウス作製支援チームは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

2020 年	267 系統	44,428 個
2021 年	215 系統	40,528 個
2022 年	179 系統	29,016 個

2）トランスジェニックマウスの作製

	依頼数	使用胚数
2020 年	2	938
2021 年	6	3,365
2022 年	4	2,802

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
2020 年	97	36,184
2021 年	97	38,469
2022 年	51	31,408

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

2020	228 strains	44,428 embryos
2021	215 strains	40,528 embryos
2022	179 strains	29,016 embryos

2）Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of injected constructs	No of injected embryos
2020	2	938
2021	6	3,365
2022	4	2,802

3）CRISPR/Cas9

	Number of requests	Number of embryos used
2020	97	36,184
2021	97	38,469
2022	51	31,408

List of Publications

Cui, G., Shimba, A., Jin, J., Ogawa, T., Muramoto, Y., Miyachi, H., Abe, S., Asahi, T., Tani-Ichi, S., Dijkstra, J.M., et al.（2022）. A circulating subset of iNKT cells mediates antitumor and antiviral immunity. Sci Immunol 7, eabj8760. 10.1126/sciimmunol.abj8760.

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 3 年度マウス；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 4 名、特定職員 1 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 mice 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

Lee S, **Hirota K**, Schuette V, Fujita T, Kato H. Attenuation of regulatory T cell function by type I IFN signaling in an MDA5 gain-of-function mutant mouse model. ***Biochem Biophys Res Commun***. 629:171-175.（**2022**）

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***. 74:641-653.（**2022**）.

Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, **Watanabe H, Kondoh G,** Kageyama R, Yagita K. Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 119（1）: e2114083119.（**2022**）

Omatsu Y, Aiba S, Maeta T, Higaki K, Aoki K, **Watanabe H, Kondoh G,** Nishimura R, Takeda S, Chung UI, Nagasawa T. Runx1 and Runx2 inhibit fibrotic conversion of cellular niches for hematopoietic stem cells. ***Nature Communications.*** 13（1）:2654.（**2022**）

Yoshida K, Hada M, Kizu A, Kitada K, Eguchi-Kasai K, Kokubo T, Teramura T, Yano S, Suzuki HH, **Watanabe H**, **Kondoh G,** Nagamatsu A, Saganti P, Cucinotta FA, Morita T. Comparison of biological measurement and physical estimates of space radiation in the International Space Station. ***Heliyon***. 8（8）: e10266.（**2022**）

Tanaka A, Maeda S, Nomura T, Llamas-Covarrubias MA, Tanaka S, Jin L, Lim EL, Morikawa H, Kitagawa Y, Akizuki S, Ito Y, Fujimori C, **Hirota K**, Murase T, Hashimoto M, Higo J, Zamoyska R, Ueda R, Standley DM, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Construction of a T cell receptor signaling range for spontaneous development of autoimmune disease. ***J Exp Med.*** 220: e20220386.（**2023**）

Tsukita K, Kitamata M, Kashihara H, Yano T, Fujiwara I, Day TF, Katsuno T, Kim J, Takenaga F, Tanaka H, Park S, Miyata M, **Watanabe H, Kondoh G,** Takahashi R, Tamura A, Tsukita S. Phase separation of an actin nucleator by junctional microtubules regulates epithelial function. ***Science Advance*** 9（7）: eadf6358.（**2023**）

Hirano R, Okamoto K, Shinke M, Sato M, Watanabe S, **Watanabe H, Kondoh G**, Kadonosono T, Kizaka-Kondoh S. Tissue-resident macrophages are major tumor-associated macrophage resources, contributing to early TNBC development, recurrence, and metastases. ***Commun Biol.*** 6（1）:144.（**2023**）

Nakao S, Ito K, Sakoh K, Takemoto K, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Irie T, Nakagata N, Takeo T. Dimethyl-*α*-cyclodextrin induces capacitation by removing phospholipids from the plasma membrane of mouse sperm. ***Biol Reprod.*** ioad013.（**2023**）

Nakao S, Ito K, Sugahara C, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Nakagata N, Takeo T. Synchronization of the ovulation and copulation timings increased the number of in vivo fertilized oocytes in superovulated female mice. ***PLoS One.*** 18（2）: e0281330.（**2023**）

List of Presentations

Mukoyama H, Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Regulation and cell fate of CCR2 + inflammatory monocytes in the development of T cell-dependent autoimmune arthritis 第 51 回 日本免疫学会学術集会 , 2022 年 12 月

Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Differential TCR repertoire for joint self-antigens determines the functional balance between the regulatory T and arthritogenic T cells in T

cell-mediated autoimmune arthritis 第 51 回 日本免疫学会学術集会 , 2022 年 12 月

Ohara D, **Watanabe H**, Takeuchi Y, LEE Y, Mukoyama H, **Kondoh G**, **Hirota K**. An Il23a-Venus reporter strain reveals the spatio-temporal regulation of IL-23- producing cDC2 subset in gut-associated lymphoid tissues 第 51 回 日本免疫学会学術集会 , 2022 年 12 月

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　　川瀬栄八郎　　Assoc. Prof.　Eihachiro Kawase

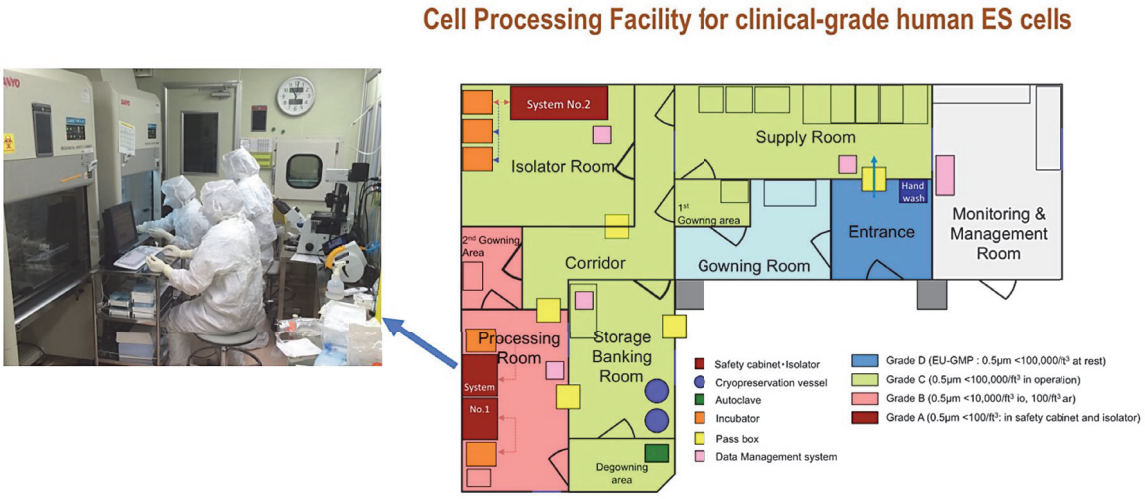
我々はヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに樹立したヒト ES 細胞株は国内の研究機関に分配され多くの研究成果が上げられている。また ES 細胞の未分化性維持や細胞分化の分子機構の解析の他、安全性の高い培養法の開発など医療応用において不可欠の技術開発研究をおこなっている。ヒト ES 細胞の臨床利用のための細胞プロセシング施設を有し、ヒト ES 細胞株の樹立，培養，操作，品質保証，安全性確保等にわたる技術開発及び取扱基準規格の構築を行っている。

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

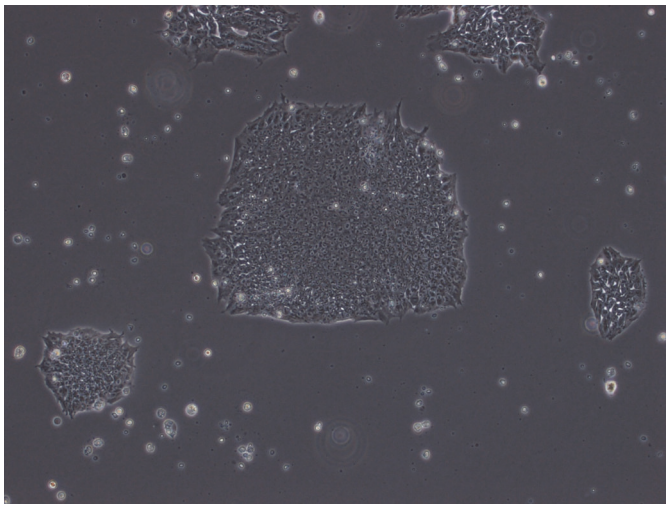
ヒト ES 細胞樹立指針や再生医療関連の法律の整備により、ヒト ES 細胞の臨床利用に向けての制度が整えられた。これらに対応して、新たに医薬品製造レベルでのヒト ES 細胞株の樹立を行うための準備を進めてきた。臨床研究に使用するヒト ES 細胞は再生医療等の安全性の確保等に関する



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。

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。2023 年 3 月までに 7 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。

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
KthES17	2022.6.17	46,XX



表（左） List of clinical-grade hESC lines established at the Institute for Life and Medial Sciences, Kyoto University.

図（右） Phase contrast microcopy of clinical-grade KthES11 cells.

そのため我々は当面 20 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。

追記

本研究分野の発展に長年貢献してきた末盛博文准教授は 2022 年 3 月に退職した。

Human ES cell lines 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 efficiently and analyzed their characters in detail. The hESC lines have been distributed to over 50 research projects in Japan. We are also researching 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 ES cell lines. We have set up standard operating procedures to produce clinical-grade hES cell lines and established a clinical-grade hES cell bank, aiming to supply them to researchers in regenerative medicine.

1）Establishment and analysis of human ES cell lines for clinical application

Embryonic stem cell lines are pluripotent stem cell lines that can be propagated indefinitely in culture, retaining their differentiation potency into every cell type of tissue in the body. Since establishing human ES cell lines was reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells is expected. In Japan, many demands have been made for using human pluripotent stem cells, including human ES cells, in basic and pre-clinical research. We established human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established five human ES cell lines. We have distributed these cell lines to over 50 research projects.

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

Several issues remain to be solved for the clinical application of hES cells, such as developing a complete-defined culture medium and feeder-cell-free substrates. We should establish a standard that reaches international levels to verify these factors. We have been working as a member of the ISCBI（International Stem Cell Banking Initiative）working groups to achieve that purpose. 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 develop guidelines for the clinical use of human ES cells.

Based on this research, we started deriving 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 6 cell lines by June 2022. Frozen stocks of these cell lines are ready for distribution to research institutes aiming for clinical application of hESCs.

List of Publications

Takada, K., Nakatani, R., Moribe, E., Yamazaki-Fujigaki, S., Fujii, M., Furuta, M., Suemori, H., and Kawase, E.（2022）. Efficient derivation and banking of clinical-grade human embryonic stem cell lines in accordance with Japanese regulations. **Regen Ther** *21*, 553-559.

Kim, J.H., Kawase, E., Bharti, K., Karnieli, O., Arakawa, Y., and Stacey, G.（2022）. Perspectives on the cost of goods for hPSC banks for manufacture of cell therapies. **NPJ Regen Med** *7*, 54.

川瀬栄八郎（2022）「日本の再生医療等安全性確保法に遵守した臨床用ヒト ES 細胞株の樹立とその現状」**医学のあゆみ** Vol. 281 No.2 医歯薬出版（TOPICS）195-197.

List of Presentations

川瀬栄八郎、高田圭、山崎 - 藤垣静香、末盛博文 : 京都大学における臨床用ヒト ES 細胞株の樹立事業の現状 第 22 回日本再生医療学会総会、京都、2023 年 3 月 24 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、WEB 開催、2022 年 3 月 18 日

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、WEB 開催、2022 年 3 月 18 日

共同研究

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2021 年度共同研究報告（研究期間：2021 年 4 月～ 2022 年 3 月）

【乳酸シグナル伝達経路の解明】

◯研究代表者　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

◯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

がんは、Warburg 効果によって、通常酸素存在下であっても解糖系を亢進し、多量の乳酸を分泌することが知られている。我々は、これまで、がんから分泌される乳酸が、がんの微小環境に炎症を誘導する IL-23/IL-17 経路を活性化することを示してきた。今回、乳酸が IL-23 分泌を促進する分子メカニズムを解明するために、遊佐宏介教授が開発したゲノムワイド CRISPR スクリーニング法を用いて、その乳酸シグナル経路に関わる分子の同定を試みた。我々は、すでに、乳酸に応答するプロモーター領域を同定しているため、そのプロモーターに EGFP を連結し、乳酸依存的に EGFP の発現が増強する系を確立した。ゲノムワイド CRISPR スクリーニング法を用いて、幹細胞遺伝学分野でスクリーニングを行い、乳酸シグナルに関わる幾つかの遺伝子を同定することができた。今後、これらの遺伝子が、どのように乳酸シグナルに関連するかを解明していく予定である。

◯研究成果の公表

（学会発表）

1. 馬場崇、遊佐宏介、井上徳光　ゲノムワイド CRISPR スクリーニングによる乳酸シグナル解明の試み　第 49 回和歌山悪性腫瘍研究会　2021 年 12 月 11 日

【Elucidation of the molecular principle underlying the cellular sodium responses related to proinflammatory M1 macrophage function by genome-scale CRISPR knockout screening.】

◯研究代表者　Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Professor Dominik N. Müller

◯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：

共同研究先である Müller 研では、これまで塩分（NaCl）によりマクロファージおいて炎症が惹起されることを見出してきた。しかしその責任分子の解明は不十分であり、本共同研究において遊佐研の持つゲノムワイドな CRISPR screening 技術を用いることで、塩分による炎症惹起を構成する新規因子の探索を行なった。まず初めに NaCl に反応して上昇する遺伝子である Nos2, Chst1, Rab15 に 2A 配列と tdTomato 配列を持つレポーター細胞（RAW264.7 細胞）を作成した。これら三種類（Nos2-,Chst1-,Rab15-tdTomato）の細胞を用いてゲノムワイドな CRISPR screening を行ったところ、これらの遺伝子を上昇させる機能を持つと思われる遺伝子が同定された。現在は引き続き、同定された遺伝子の機能解析を行なっている。

○研究成果の公表
なし

【骨格筋由来細胞外小胞の骨再生メカニズムの解明】
○研究代表者　近畿大学医学部再生機能医学講座　高藤　義正　助教
○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

【細胞分化と共役する概日時計の組織形成における意義】
○研究代表者　京都府立医科大学大学院医学研究科　八木田　和弘　教授
○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　統合生体プロセス分野　近藤　玄　教授
○研究経過及び研究成果

申請者はこれまで、哺乳類の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明らかにし、細胞時計の概念確立に貢献した（Yagita et al, Science, 2001）。その後、全身の細胞に広く概日時計が備わっている意味について検討を重ね、細胞レベルの概日時計が細胞分化と共役することを世界で初めて明らかにした（Yagita et al, PNAS, 2010; PNAS, 2014）。さらに、細胞分化と共役した概日時計の成立メカニズムがマウスの個体発生においても重要な役割を果たしていることを明らかにし、細胞の普遍的生理機能としての概日時計に新たな視点をもたらした（PNAS, 2017）。また、ある種の腫瘍組織では、概日時計が障害されることを見出し、そのメカニズムが細胞分化と共役する概日時計形成機構と共通することを示唆した（Genes Cells, 2018）。これらの成果を受け、本共同研究では細胞分化と共役する概日時計の組織形成における意義について、特に、発生プロセスに焦点を当て概日時計の形成と発生制御との関連について解析した。

その結果、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結果、概日時計の鍵転写因子である CLOCK/BMAL1 複合体の機能抑制が正常な体節形成制御に必須であることが示唆された（PNAS 2022）。これらのことから、従来、概日時計は、個体機能及び細胞機能の恒常性を維持することがその存在意義であると考えられてきたが、個体発生プロセスにおいては正常な形態形成制御との関連で、概日時計の抑制が必須である可能性が見えてきた。
○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**., Circadian key components CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids., ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, 119, e2114083119, 2022
（学会発表）
1. Yagita K., Circadian Rhythm Disorders: Chronic circadian misalignment-induced pathophysiology., 5th Asian Forum on Chronobiology, Kaifeng（Online）, July 18, 2021（シンポジスト招待講演）
2. Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Watanabe H, Kondoh G, Kageyama R, Yagita K. Circadian key

component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids. 85th Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Quantitative Biology, Biological Time Keeping, Online, June 1 - 5, 2021.（ポスター）

【マウス単一エキソン型性決定因子 SRY-S 分解機構の解明】

○研究代表者　大阪大学大学院生命機能研究科　立花　誠　教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　幹細胞遺伝学分野　遊佐　宏介　教授

【がん免疫における MAIT 細胞の機能解明】

○研究代表者　獨協医科大学先端医科学研究センター　若尾　宏　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

研究代表者らはマウスに微量にしか存在しない自然免疫型 T 細胞である MAIT 細胞を iPS 細胞から大量に産生する手法を確立している。これら細胞はがん転移モデルマウスにおいて同系マウスへの養子移入により、移植がんの転移を抑制することが知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。今回、研究代表者らは iPS 細胞由来 MAIT 細胞（以下、reMAIT 細胞）によるがん転移抑制活性は NK 細胞依存的であることを証明した。まず、reMAIT 細胞と肝臓より精製した NK 細胞を共培養することで、reMAIT 細胞は NK 細胞用量依存的に活性化され、細胞傷害活性発揮に重要なグランザイム、Fas リガンド、Tnfsf10 などの転写を亢進させた。続いて、reMAIT 細胞ががん細胞に対して細胞傷害活性を発揮し、がんを殺傷するかを調べた。その結果、reMAIT 細胞はリンパ腫のみならず肺がん細胞をも殺傷でき、さらにこの活性は NK 細胞によって亢進されることを見出した。この時、NK 細胞と reMAIT 細胞とは相乗的に働いて細胞傷害活性を発揮した。最後に、この活性が生体内でも見られるのかを明確にするために野生型マウス（C57BL/6）から NK 細胞を選択的に除去した上で、reMAIT 細胞移入、がん細胞の移植を行なった。その結果、NK 細胞が存在するマウス群に比して、この細胞を除去されたマウス群の生存期間は有意に短縮された。これはマウスにおいて NK 細胞が移入 reMAIT 細胞の抗がん活性発揮に必要であることを意味し、これら細胞が互いにアジュバントとして機能していることを示唆する。

○研究成果の公表

（発表論文）

Chie Sugimoto, Yukie Murakami, Eisuke Ishii, Hiroyoshi Fujita, and **Hiroshi Wakao** Reprogramming and redifferentiation of mucosal-associated invariant T cells reveal tumor inhibitory activity eLife 2022;11:e70848

【常在収縮力計測による多能性幹細胞の分化状態評価】

○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

○研究経過及び研究成果

細胞は細胞外マトリックスに形成する接着斑を通じて周囲の力学的刺激を感知し，その情報をもとに遺伝子発現や分化方向性を決定することが知られている。例えば，細胞外基質の硬さに応じて間葉系幹細胞の分化方向性が変わることが報告されている（Engler et al., Cell, 2006）。高い増殖能を有する多能性幹細胞は、その分化状態に応じた固有の常在収縮力を接着基板に及ぼしていると考えられる。しかしながら、「力」は分子マーカーとは異なり，通常目に見えず、その評価も難しい。そのため，収縮力の重要性は的確には認知されていない。そこで，本研究では，研究代表者らが独自に開発した細胞収縮力解析技術を活用し、多能性幹細胞の常在収縮力の大規模解析を行うことにより，常在収縮力と分化状態の相関関係が明らかにすることを目的としている。

本件度は，研究代表者らにより開発された「細胞収縮力アッセイ基板」を用い，細胞の分化状態を識別できるように蛍光標識を施した上で，ヒト iPS 細胞の分化に伴う常在収縮力の評価を目指した．本法では，細胞が基板に及ぼす「トラクションフォース」に応じて基板表面が変形し，しわが形成される．このしわの形成を常在収縮力のリードアウトとして用いることにより，分化等の細胞状態変化を評価する．本研究では，分化に伴ってアクチン骨格構造が発達し，収縮力が増加すると仮定した．そこで，硬さの異なる収縮力アッセイ基板上でヒト iPS 細胞を培養，3 日以上タイムラプス顕微鏡観察を行いながら，細胞状態変化に伴うしわ形成の画像データを取得した．そして，画像データを元に機械学習（AI）による大規模解析を行い，分化状態と常在収縮力の相関関係を評価した。細胞の分化状態を識別するために，未分化なヒト iPS 細胞を選択的に染色する rBC2LCN-FITC（AiLecS1-FITC）により細胞ラベリングを行った．

その結果，未分化な細胞集団における微弱な収縮力とは対照的に，分化した細胞集団においては比較的高い収縮力が確認された。また，細胞コロニーの中心部に比べて，細胞エッジでは高い収縮力が確認された．内部に比べてコロニーエッジにおいて張力が比較的高いことはマウス ES 細胞を用いた研究でも確認されている（Ando et al., Stem Cell Research, 2021）．つまり，多能性幹細胞のコロニーのエッジにおける張力が分化トリガーとなり，エッジから内部へと多能性状態が変化することを示唆している．このことを踏まえると，本研究で確認されたヒト iPS 細胞分化と常在収縮力の関係は，物理的な因子（例えばエッジ張力）が多能性状態の調節に何等かの影響を及ぼしていることを示唆しており，細胞分化における力学的因子の役割の理解に知見を与える．

今後，収縮力計測と合わせて，yes associated protein（YAP）依存のメカノトランスダクションパスウェイも検討し，細胞が接着基板から感知する力学的因子が細胞内張力を介して遺伝子発現を調節し，分化に至るまでの過程を明らかにしていきたい．そのために，現在 mCherry-YAP を導入した細胞を用いた実験を進めている．

○研究成果の公表

（発表論文）

1. **Shinji Deguchi**, Machine learning-based detection of cellular forces and its application to drug screening, International Conference on Future Healthcare and Economic Development, Taiwan, online, invited, September 23-29.
2. **Shinji Deguchi**, Cellular adaptation to mechanical environment, MEI Summer School International

Symposium 2021, online, invited, August 4-6.

3. **Shinji Deguchi**, Wrinkle force microscopy: a machine learning-based approach to evaluate cellular forces, DevMech Webinar, Online, invited, June 9.
4. *Yuta Ando, **Kennedy O. Okeyo**, Taiji Adachi, Pluripotency state of mouse ES cells determines their contribution to self-organized layer formation by mesh closure on microstructured adhesion-limiting substrates, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 590, pp. 97-102（2022）.
5. **Kennedy O. Okeyo**, Yoshikiyo Kibe, and Taiji Adachi, Controlling macroscale cell alignment in self-organized cell sheets by tuning the microstructure of adhesion-limiting micromesh scaffolds, Materials Today Advances, Vol. 12, #100194（2021）.
6. *Yuta Ando, **Kennedy O. Okeyo**, Junko Sunaga, and Taiji Adachi, Edge-localized alteration in pluripotency state of mouse ES cells forming topography-confined layers on designed mesh substrates, Stem Cell Research, Vol. 53, #102352（2021）.

【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】

○研究代表者　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
○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
○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

骨粗鬆症診療においては、様々な薬剤の併用、切り替え、休薬など長期間にわたる薬剤治療戦略が必要となる。長期的な治療効果を in silico によって予測するためには、薬剤ごとに異なる投薬あるいは休薬の骨代謝活動への影響を、数理的に表現することが重要である。本研究では、薬剤の長期投与や休薬による薬剤効果の推移を、細胞動態に基づき解析可能な骨代謝数理モデルを構築した。

これまで開発してきた、骨細胞、破骨／骨芽細胞、および破骨／骨芽前駆細胞の活動を考慮した数理モデルに対して、薬剤単回投与後の効果の推移を表現する効果関数を導入した。この効果関数を、単回投与後の骨代謝マーカーの推移に基づき規定することによって、薬剤ごとに固有な薬剤効果の時間推移を表現した。

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海綿骨モデルを用いて、骨吸収抑制薬を長期投与後に休薬する条件で骨粗鬆症治療シミュレーションを実施した。その結果、薬剤投与中は骨リモデリング抑制が起こり、破骨前駆細胞数が増加した。投与中止後は、破骨前駆細胞数増加の影響により骨吸収が亢進することで、急速な骨量減少をきたす機構が表現された。今後、本数理モデルは、薬剤併用や切り替えなどの効果解析へと応用していく予定であり、骨粗鬆症に対する長

期的な治療戦略の策定を支援する技術の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、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　伊勢 Online　2021 年 10 月 14-15 日
2. 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）, Kyoto, Online, December 2-5, 2021.

【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】
○研究代表者　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
○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　附属ヒト ES 細胞研究センター　末盛　博文　准教授
○研究経過及び研究成果
ヒト心臓は生体から直接採取することが困難であるため、その拍動制御機構は解析が進んでいない。そこで本研究では、ヒト ES/iPS 細胞由来心臓オルガノイドによりヒト心臓を再現し、この心臓オルガノイドと光操作技術を用いた時期・部位特異的な遺伝子の過剰発現やノックアウト、分化誘導過程における細胞追跡の実験系を組み合わせることにより、ヒト心臓の発生過程や拍動制御機構の解明を目指すことを目標としている。
今年度は光操作を可能とするヒト ES/iPS 細胞株の樹立を進めてきた。光操作ツールには、我々が開発してきた PA-Cre3.0 を用いる（Morikawa K, et al. *Nat Commun.* 2020）。まず、ヒト ES/iPS 細胞において、恒常的に PA-Cre3.0 を発現できる恒常発現ベクターを構築した。作製したベクターを培養細胞で一過性に発現し、青色光を照射すると、PA-Cre の活性化が引き起こされることが判明した。さらに、暗所群ではほぼ全く活性化が起こらないことも判明している。これで、デザインした通りにベクターが機能することがわかったので、続いて恒常発現ベクターを、Nucleofection 法によりヒト iPS 細胞へ導入した。G418 による選択培養後、計 33 株のストックを作製した。また、細胞株の樹立と同時に青色光照射によるスクリーニングを行い、31 株で青色光照射時に PA-Cre が活性化することを確認している。現在、PA-Cre による組換え効率の最も高かった 3 株を用いて、心筋分化誘導時の PA-Cre の活性化と、細胞系譜追跡の検証を進めている段階である。さらに、ヒト ES 細胞についても同様方法で細胞株の樹立を進めている。現在までに、PA-Cre の恒常発現ベクターを遺伝子導入した 44 株の樹立を完了し、今後細胞株のスクリーニングを進めていく予定である。
○研究成果の公表
（学会発表）
1. 森川久未　光操作技術 PA-Cre による発生解析アプリケーションの開発　第 44 回日本分子生物学会年会（2021 年 12 月 1 日）
2. 森川久未　光遺伝学技術 : PA-Cre3.0 による生命現象の時空間解析手法の確立　第 20 回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会（2022 年 6 月 28, 29 日）

【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】

○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　田畑　泰彦　教授

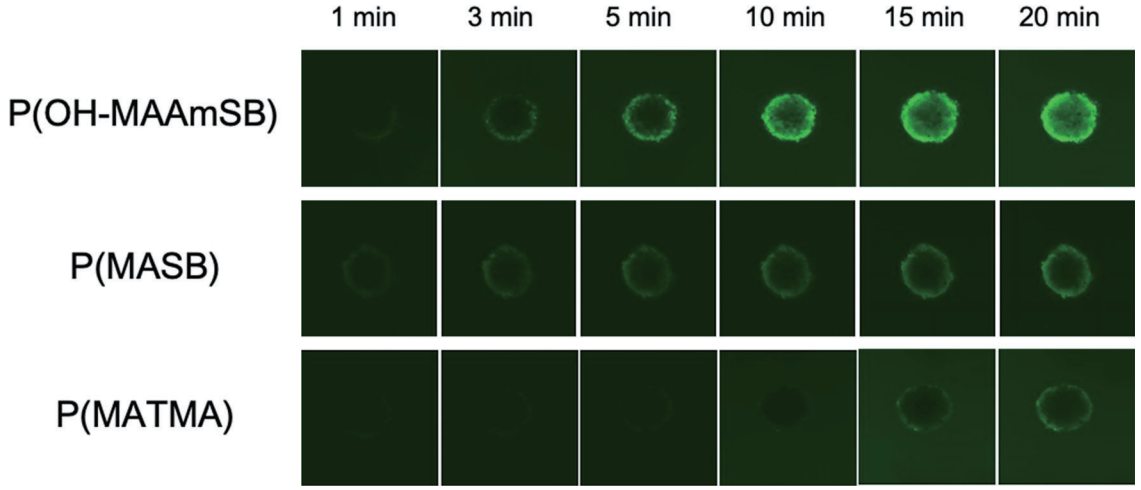
○研究経過及び研究成果：

がん細胞からなる細胞凝集体は、がん微小環境に類似の低酸素状態や細胞機能などをもち、平面培養された細胞とは異なる薬物浸透性を示すため、ドラッグデリバリーシステム（DDS）研究に利用されつつある。われわれは、がん細胞からなる細胞凝集体を利用して、スルホベタインポリマーの一つである 3- ジメチル（メタクリロイルオキシエチル）アンモニウムプロパンスルホン酸：P（MASB）が、細胞凝集体浸透性を有することを明らかにした。さらに、スルホベタインポリマーの化学構造が、がん細胞内部への移行挙動に対して影響を及ぼすことを見いだしつつある。

本研究では、高浸透性ナノキャリアとして、スルホベタインメタクリレートと（メタ）アクリルアミドの双性イオンポリマーを、双性イオン間に水酸基を有するものと有しないものの 2 種類を調製した。得られたスルホベタインポリマーを蛍光標識し、スルホベタインポリマーの化学構造ががん細胞からなる細胞凝集体浸透性に与える影響について評価した。

ヒト肝がん細胞株（HepG2 細胞）を低接着プレートに対して 1.5 x 10^3 cells/well で播種し、4 日間前培養することにより細胞凝集体を得た。得られた細胞凝集体の培養液に蛍光標識ポリマー水溶液を添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞凝集体浸透性を評価した。

ヒドロキシ基を有するメタクリルアミドポリマーであるポリ（2- ヒドロキシ -3-（(3- メタクリルアミドプロピル）ジメチルアンモニオ）プロパン -1- スルホン酸）：P（OH-MAAmSB）は、単層培養細胞に対する細胞毒性が小さかった。さらに、P（OH-MAAmSB）は、速やかに細胞凝集体に浸透し、約 150 秒で中心領域（直径約 325μm）に到達した。この細胞凝集体浸透性は、これまでに報告してきた P（MASB）と比較して、より高かった。一方、カチオン性ポリマーである poly（trimethyl-2-methacroyloxyethylammonium）：P（MATMA）は、周辺からわずか 1 ～ 2 層までしか浸透しなかった。P（OH-MAAmSB）の優れた細胞凝集体浸透性は、その良好な水溶性と側鎖のコンフォメーションに起因することが示唆された。以上より、化学構造を変化させることにより高い細胞凝集体浸透性をもつ DDS キャリアを分子設計することができた。



○研究成果の公表

（発表論文）

N. Morimoto, K. Ota, U. Miura, H. Shin, **M. Yamamoto**, Sulfobetaine polymers for effective permeability into multicellular tumor spheroids（MCTSs）. *J. Mater. Chem. B* 10（14）: 2649-2660（2022）.

【幹細胞分化に関わる RNA 結合タンパク質の相分離性解析】

○研究代表者　立命館大学生命科学部　吉澤　拓也　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　服部　鮎奈　准教授

【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―】

○研究代表者　広島大学統合生命科学研究科　高橋　治子　助教

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　発生システム制御分野　永樂　元次　教授

【Principles of chromatin nanomechanical dynamics and its role in transcription and stem cell identity】

○研究代表者　Helsinki Institute of Life Science University of Helsinki Professor Sara Wickström

○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

【生体内追跡システムを備えた iPS 細胞由来 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 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

【PRRX1+ 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解】

○研究代表者　岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（医）　宝田　剛　教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　組織再生応用分野　戸口田　淳也　教授

○研究経過及び研究成果：

骨格形成過程での幹細胞を頂点とした階層性の理解は不十分である。申請者らは以前に、マウス骨格形成過程が、$Prrx1^{+}Sca1^{+}$ 細胞を幹細胞とした Prrx1+ 細胞内の不均一性を起点として生じることを報告した（Takarada et al, Development, 2016）。これまでに、独自に樹立した PRRX1 レポーターヒト iPS 細胞株を利用して、ヒト多能性幹細胞から PRRX1 陽性肢芽間葉系細胞への発生過程を模倣した誘導に成功していた。また、PRRX1 陽性肢芽間葉系細胞から、発生過程にて一過的に出現する PRRX1 陽性軟骨前駆細胞への誘導および PRRX1 陽性軟骨前駆細胞の拡大培養方法も開発することで、軟骨再生医療や疾患モデリング / 創薬応用への道筋を示すことができた（**PCT/JP2020/035517**、***Nature Biomedical Engineering***, 2021）。さらに、シングルセル RNA シークエンスを利用して、Prrx1 陽性細胞内に含まれる各亜集団（軟骨前駆細胞、骨芽前駆細胞、腱靭帯前駆細胞、真皮線維芽前駆細胞）を同定し、それら亜集団の分化系譜の Trajectory 情報を取得した。これまで

は、特定細胞系譜で連続的な遺伝子変化を in vivo にて解析することはできなかったが、特定細胞系譜の Trajectory 方向で有意に変化する遺伝子を探索し、それらの pathway 解析を行うことが可能となった。最終的にこれらの知見を踏まえて、PRRX1 陽性ヒト肢芽間葉系細胞から、ほぼ 100% に近い誘導効率で各系譜への細胞を誘導するシグナルを同定することに成功した。

○研究成果の公表

（発表論文）

Daisuke Yamada, Masahiro Nakamura, Tomoka Takao, Shota Takihira*, Aki Yoshida, Shunsuke Kawai, Akihiro Miura, Lu Ming*, Hiroyuki Yoshitomi, Mai Gozu, Kumi Okamoto, Hironori Hojo, Naoyuki Kusaka*, Ryosuke Iwai, Eiji Nakata, Toshifumi Ozaki, Junya Toguchida, **Takeshi Takarada**. Induction and stable expansion of human pluripotent stem cell derived PRRX1-positive limb bud mesenchymal cells. *Nature Biomedical Engineering*, 2021 Vol. 5 Issue 8 Pages 926-940

（学会発表）

1. 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 .
2. 山田大祐、高尾知佳、中村正裕、Ming Lu*、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 34 回日本軟骨代謝学会 . 2022 年 2 月 18 日 .
3. 山田大祐、高尾知佳、中村正裕、Ming Lu*、戸口田淳也、宝田剛志 . 骨系統疾患特異的 iPS 由来ヒト肢芽間葉系細胞を用いたハイスループット薬剤スクリーニングシムテムの構築 . 第 95 回日本薬理学会年会 .2022 年 3 月 8 日 .

（特許取得）

LBM、CPC、OPC、それらの調製方法及び品質管理方法、キット、移植材料並びに疾患モデル

LBM、CPC、OPC、PRODUCTION AND QUALITY CONTROL METHOD THEREOF, KIT, GRAFT MATERIAL AND DISEASE MODEL

発明人　宝田剛志、山田大祐、高尾知佳、吉富啓之、戸口田淳也

出願人　国立大学法人岡山大学、国立大学法人京都大学

JP 特願 2019-169278　日本　出願　2019/9/18

JP 特願 2020-062441　日本　出願　2020/3/31

PCT/JP2020/035517　国際　出願　2020/9/18

【筋・腱・靭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】

○研究代表者　広島大学大学院医系科学研究科　宿南　知佐　教授

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

○研究代表者　東京大学大学院薬学系研究科　堀　昌平　教授

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

【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】

○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CAR細胞（ケモカインCXCL12を高発現する細網細胞）が、造血幹細胞の維持に必須の微小環境（ニッチ）を構成する中心的な細胞であることが明らかになった。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 et al., ***Nature*** 2014; Seike et al., ***Gene Dev.*** 2018）。さらに最近、ヒトにおいてもCAR細胞とほぼ同等の特徴を持つ細胞が存在することが示された（Aoki et al., ***Br. J. Haematol.*** 2021）。

一方、BCR-ABLキメラ遺伝子を導入した造血幹細胞を移植する慢性骨髄性白血病（CML）モデルマウスや、骨髄線維症モデルマウス等の解析により、骨髄造血の異常に伴ってCAR細胞の遺伝子発現が著しく変化することが明らかになった。興味深いことにCXCL12, SCF, Foxc1などの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複数の遺伝子の発現上昇が認められた。これらの遺伝子は炎症や感染などのストレスによって誘導されるCAR細胞のニッチ機能の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、これらの遺伝子の機能やCAR細胞を変質させるシグナル経路を解明し、ニッチの変質と再生における分子機構を明らかにすることを目的とした。

骨髄造血の異常を伴う複数の疾患モデルマウスにおいて共通してCAR細胞で発現が上昇することが確認された機能不明の遺伝子について、その機能解析のためにfloxマウスを作製した。これらをCAR細胞特異的Cre発現マウスと交配することによりCAR細胞特異的欠損マウスを作製し、現在、定常時および種々の疾患モデルにおける骨髄造血とCAR細胞の表現型解析を進行している。さらにTNFα, IL-6, IL-1βなどの炎症性サイトカインがCAR細胞に与える影響を解析するためにこれらのサイトカインの受容体遺伝子のfloxマウスを作製または入手した。これらの受容体を欠損させたマウスではリガンドの生体投与によるCAR細胞の変質が抑制されることが確認された。現在、これらのマウスを用いて種々の疾患モデルにおいて病態およびCAR細胞遺伝子発現の変化の解析を進行している。

○研究成果の公表

（学会発表）

1. Omatsu Y., “Niches for hematopoietic stem cells in bone marrow”
   Virtual Immunology 2021, AAI（アメリカ免疫学会）Annual Meeting, 2021（on line）
   Japanese Society for Immunology（JSI）Symposium, Osteoimmunology: The Interplay Between the Immune System and Bone
2. 尾松芳樹,「骨髄造血幹細胞ニッチを構成する間葉系幹細胞」

第 42 回 日本炎症・再生医学会学術集会 , シンポジウム , 2021 年 7 月 7 日（オンライン開催）

【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】

◯研究代表者　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

◯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

【受精適期における精子選別機構の解明】

◯研究代表者　熊本大学生命資源研究・支援センター　竹尾　透　教授

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

【課題名公表不可】

◯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

【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】

◯研究代表者　大阪大学生命機能研究科　帝京大学戦略的イノベーション研究センター 兼任
月田 早智子　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

【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　滋賀医科大学生化学・分子生物学講座　縣　保年　教授

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者　再生免疫学分野　河本　宏　教授

◯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。本年度は、それらのクローンを T 細胞へと分化誘導させ、高いがん抗原特異的キラー活性を持つことを確認した。

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、これらの研究成果を論文発表した（Terada K et al. **Molecular Therapy – Oncolytics** 2022）。さらに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）

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**.（2022）**Molecular Therapy – Oncolytics**. Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating and circulating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model. 24:77-86

（学会発表）

1. Koji Terada, Kenta Kondo, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Hiroshi Kawamoto, Yasutoshi Agata. Development of “TCR cassette method”: Regeneration of CTLs from iPSCs in which tumor-antigen specific TCR genes can be efficiently introduced into the endogenous TCR locus by cassette exchange. 第 50 回 日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日
2. Koji Terada, Kenta Kondo, Hirohito Ishigaki, Ayaka Nagashima, Hiroki Satooka, Seiji Nagano, Kyoko Masuda, Teruhisa Kawamura, Takako Hirata, Kazumasa Ogasawara, Yasushi Itoh, Hiroshi Kawamoto, Yasutoshi Agata. Isolation of TCR genes with tumor-killing activity from tumor-infiltrating lymphocytes in a tumor rejection cynomolgus macaque model. 第 50 回 日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日
3. Kenta Kondo, Tatsuya Hasegawa, Koji Terada, Yasutoshi Agata. Vitamin C alters gene expression of CD8+ T cells through DNA demethylation. 第 50 回 日本免疫学会学術集会、奈良、2021 年 12 月 8-10 日
4. 寺田晃士、永野誠治、近藤健太、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する . 第 30 回 Kyoto T Cell Conference, オンライン開催、2021 年 10 月 8-9 日
5. 近藤健太、寺田晃士、石垣宏仁、長嶋彩花、里岡大樹、永野誠治、増田喬子、川村晃久、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もつ TCR 遺伝子を単離する . 第 30 回 Kyoto T Cell Conference, オンライン開催、2021 年 10 月 8-9 日

【Towards the Understanding of Individual Roles of Different CAF Populations in the Progression of Human Hepatocellular Carcinoma】

○研究代表者　INSERM MONTPELLIER CANCER RESEARCH INSTITUTE　Andrei Turtoi　Team Leader “Tumor Microenvironment and Therapy Resistance”

○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

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点
2021 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2021 年 4 月～ 2022 年 3 月）

①新型コロナウイルス研究

新型コロナウイルス研究として計 10 件の研究を行った。

【ヒト iPS 細胞における SARS-CoV-2 感染・複製能の評価】

◯研究代表者：京都大学 iPS 細胞研究所　講師　高山　和雄
◯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：

ACE2 を発現したヒト iPS 細胞を作製することによって、未分化ヒト iPS 細胞においても SARS-CoV-2 が高効率に感染・複製できる。また、8 名（うち男性 4 名、女性 4 名）のドナーより樹立した ACE2-iPS 細胞において SARS-CoV-2 感染実験を行ったところ、男性 iPS 細胞の方がウイルス産生能が高いことを明らかにした。ACE2-iPS 細胞は SARS-CoV-2 感染の個人差を再現するツールとして活用されることが期待される。

【新型コロナウイルス特異的免疫応答解析】

◯研究代表者：京都大学医学研究科　免疫細胞生物学　教授　上野　英樹
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　橋口　隆生、教授　小柳　義夫、
助教　志村　和也
◯研究成果：

本研究で、感冒コロナウイルス感染で誘導される T 細胞による交差反応性が新型コロナウイルス感染症での経過と大きく影響することを見出だした。男女の性差によって T 細胞免疫応答の質に大きな差があり、さらに年齢によっても大きな差があることを見出した。

【SARS-CoV-2 蛋白質の性状解析と感染阻害抗体の開発】

◯研究代表者：北海道大学大学院薬学研究院　教授　前仲　勝実
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　橋口　隆生
◯研究成果：

本研究では、先行研究と比較して優れた中和活性と交差性、ハムスターモデルでの予防・治療を有する抗体 NT-193 について、標的である SARS-CoV-2 スパイクタンパク質との共結晶構造の決定に成功し、高い中和活性と交差反応性の構造基盤を解明した。また、クライオ電子顕微鏡解析を用いた構造決定にも目処をつけ、両方の抗体の結合モードを明らかにした。

【新型コロナウイルスに対する中和抗体の解析】

◯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、教授　野田　岳志、

助教　志村　和也
◯研究成果：
COVID-19 患者の末梢血 B 細胞をシングル・セル・ソートし、抗体遺伝子を増幅して　1102 個の組み替え抗体を作成した。得られた抗体の 8% が S タンパク質に結合し、5 抗体（5.7%）が SARS-CoV-2 に対する中和活性を示した。これらの中和抗体はアルファ株には有効であったが、ベータ、ガンマ株は S タンパク質の RBD への結合が非常に強い 2 抗体しか中和することができなかった。

【SARS-CoV-2 に対する抗体測定を用いた COVID-19 の病態評価】
◯研究代表者：大阪急性期・総合医療センター　精神科　主任部長　松永　秀典
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　朝長　啓造、助教　牧野　晶子
◯研究成果：
ラジオリガンドアッセイを用いて、SARS-CoV-2 の N 蛋白に対する抗体測定を行った。また、ワクチン接種の数か月後に N 蛋白に対する抗体をラジオリガンドアッセイで測定することにより、感染が抑制されたか否かを調べた。

【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】
◯研究代表者：群馬大学医学系研究科　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、助教　牧野　晶子
◯研究成果：
低病原性のコロナウイルスとしてヒトコロナウイルス NL63 を用いて、感染性 cDNA の構築を行った。全長の cDNA の構築には Gibson Assemble kit を用いることで長鎖 DNA 断片を複数断片細菌人工染色体にクローニングを行った。感染性 cDNA の配列を確認した後、スパイク遺伝子のみを入れ替えたキメラウイルスの作出を試みた。

【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】
◯研究代表者：京都大学医学研究科　教授　長尾　美紀
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　朝長　啓造、助教　牧野　晶子

【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】
◯研究代表者：京都大学 iPS 細胞研究所　教授　齊藤　博英
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　朝長　啓造、助教　牧野　晶子
◯研究成果：
本年度は、新型コロナウイルス産生細胞が発現する small RNA（svRNA）の機能解析を高山研究室と共同で行った。svRNA の機能を阻害する inhibitor あるいは svRNA の機能を模倣する mimic の感染細胞への導入が、SARS-CoV-2 の複製に寄与することを明らかにし、特許申請に至った。

【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】

◯研究代表者：京都大学医学研究科　教授　大森　孝一

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　朝長　啓造、助教　牧野　晶子

【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】

◯研究代表者：京都大学医学研究科　特定准教授　後藤　慎平

◯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：

ヒト iPS 細胞から肺原芽細胞に分化誘導して表面抗原を用いて単離後、気液界面培養で気道や肺胞上皮細胞を作成して薬効評価用に細胞を提供した。SARS-CoV-2 感染時の遺伝子発現応答は気道と肺胞では反応が異なることを見出した。分化誘導ごとに結果がばらつくことを防ぐ工夫として、肺原芽細胞を磁気ビーズで標識したあと、自動単離装置を用いる方法で、肺原芽細胞を凍結保存して、凍結毎に細胞の回収率、肺原芽細胞細胞の分化マーカー NKX2.1 の陽性率などを計測することで、品質管理が可能となった。

②ウイルス解析研究

ウイルス解析研究として計 8 件の研究を行った。

【インフルエンザウイルスの核内複製機構の解明】

◯研究代表者：国立感染症研究所・感染病理部　非常勤研究員　宮本　翔

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　野田　岳志、助教　中野　雅博

◯研究成果：

ウイルス感染細胞におけるインフルエンザウイルスの複製に必要な vRNP 構成タンパク質が感染初期に核小体に局在することが明らかとなった。特に NP においては異なる複数のウイルス株において核小体局在が確認され、インフルエンザウイルスに共通した現象であることが示唆された。この NP の核小体移行は機能的な RNP 形成に必須であることが実証され、核小体がインフルエンザウイルスの核内複製において重要な役割を果たすことが明らかになった。

【サルエイズモデルにおける CTL の腸管感染防御能に関する研究】

◯研究代表者：国立感染症研究所エイズ研究センター　センター長　俣野　哲朗

◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授　三浦　智行、技術専門職員　阪脇　廣美、教授　明里　宏文

◯研究成果：

これまでの研究を発展させ、SIV Gag/Vif 断片連結抗原発現 SeV ベクターワクチン接種後に SIV 経直腸チャレンジを行ったサルの解析研究を継続･発展させ、本ワクチンによる Gag/Vif 特異的 CTL 細胞反応の選択的誘導に基づく感染防御効果を明らかにした。本研究結果は、多様性の高い Env 抗原を用いない HIV ワクチンで初めて粘膜感染防御効果を示したものとして重要な成果である。

【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：

優勢な抗ウイルス免疫機能を維持した HIV 潜伏感染カニクイザルをモデル動物として用いて、既存の末梢血での HIV 定量法に加えリンパ組織におけるプロウイルス DNA（pDNA), 細胞内ウイルスゲノム RNA（CA-US-vRNA）のコピー数 , 定量的感染性ウイルス定量系からなるリザーバー定量システムを駆使することにより、shock and kill 療法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が明らかとなった。

【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（⊿CCR5 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。移植後明らかな有害事象を認めることなく経過したが、骨髄内に iPS 細胞由来の移植細胞の生着を認めず、SHIV の plasm viral load の変化も認めなかった。造血前駆細胞の分化誘導法を改良し、2 頭目のアカゲザルでの自家移植実験を準備中である。

【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】

○研究代表者：長崎大学感染症共同研究拠点　教授　南保　明日香

○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：

本研究において、研究代表者は、バイオイメージング技術を用いてウイルス粒子産生細胞での生体膜動態をリアルタイムに可視化する系を確立し、VP40 が、エンドサイトーシスを抑制すること、その一方で、エキソサイトーシスを促進することで、ウイルス粒子形成によって喪失する形質膜成分を供給するという新規知見を世界に先駆けて解明した。また、この過程に関わる分子機構として、細胞内膜輸送に関与するコート複合体と VP40 との相互作用の重要性が明らかになった。

【DNA 損傷修復系と RNA ウイルスとの相互作用の解析】

○研究代表者：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科　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：

DDR 分子群について shRNA 発現プラスミドを作成し、ボルナウイルス感染を抑制する分子を探索した。その結果、HMGB1 ノックダウンにより、ボルナウイルス複製が抑制されることが明らかとなった。他の核内で複製するウイルスにも影響するか検討し、B 型肝炎ウイルスの増殖にも

HMGB1 が関与すること見いだした。さらに、他の RNA ウイルスとの差異を明らかにするために、マーフブルグウイルスのウイルス分子と相互作用する宿主因子を探索した。

【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、研究員　三沢　尚子
○研究成果：

ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染細胞のマルチオミクス解析によって、既存の手法では解析がきわめて困難な、生体内における「真の」HIV-1 感染細胞の特徴を多角的に描き出すことに成功した。以上の研究成果を、学術論文にまとめ、Cell Reports 誌に corresponding author として発表した。

【フィロウイルスのヌクレオカプシド輸送機構の解明】

○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：

非感染性のライブセルイメージングシステムを構築し、MARV の NC 形成・輸送を担うウイルスタンパク質 NP, VP35, VP24 を同定することに成功した。また受け入れ研究室である野田先生のグループから、マールブルグウイルス NP-RNA の近原子分解能構造が報告された（本共同研究の成果の一つ）。解明したヘリックス構造はエボラウイルスの NP-RNA 構造と共通点を多く認めた。

③最先端生命科学研究

最先端生命科学研究として計 10 件の研究を行った。

【マクロファージの組織発生機構の解明】

○研究代表者：大阪大学免疫学フロンティア研究センター　特任准教授　岡部　泰賢
○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　今吉　格、技術専門員　宮地　均、
技術専門職員　北野　さつき
○研究成果：

マウスの様々な組織（腹腔、肺、肝臓、腸管、脂肪組織、脾臓、精巣、腎臓など）から常在性マクロファージを単離し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った結果、マクロファージの組織特異性を制御することが考えられる候補因子群を各組織で同定することに成功した。本共同研究において、腹腔に局在するマクロファージで特異的に発現するスフィンゴシン酸（S1P）受容体の機能を検討し、S1P を介したシグナルがマクロファージの腹腔局在に必須であることを明らかにした。

【成体神経新生による大脳認知機能調節機構の解明】

○研究代表者：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　教授　奥野　浩行

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　今吉　格

○研究成果：

1）自由行動下マウスの海馬からカルシウムイメージングを行ない、神経細胞の応答特性を解析した。

2）リコンビナーゼ依存的な赤色蛍光タンパク質レポーターマウスを新規に複数系統樹立した。

3）上記レポーターマウスに神経活動依存的にリコンビナーゼが発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせ、認知課題を遂行した際に活動した神経細胞を全脳レベルで標識する系を構築した。

【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】

○研究代表者：京都大学大学院医学研究科　准教授　野村　紀通

○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：

NTCPは胆汁酸の腸肝循環を担うトランスポーターとして機能すると同時にB型肝炎ウイルスHBVの肝細胞侵入を仲介する受容体としても働く。クライオ電子顕微鏡解析により、ヒトNTCPの構造を分解能3.4 Åで決定し、NTCP − HBV相互作用において重要なNTCPのドメイン・残基を特定した。また、NTCPの立体構造に基づいて、HBV感染の種特異性やヒト集団のなかでHBV感染非感受性となる要因を考察した。

【複合的手法による細菌型S2Pの立体構造解析】

○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ファミリーに分類される大腸菌由来のRsePおよびオルソログのX線結晶解析に成功した。部分断片の構造解析や化学修飾実験で予想されていた通り、PDZタンデムは、嵩高い状態の基質が活性中心に侵入するのを抑制するような配置をとっていた。また、膜に埋もれたβ-ヘアピンは実際にはβ-シート構造をとることが明らかになった。構造情報に基づいて変異体解析を行うことで、基質認識や切断に重要な残基や領域を同定した。

【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：

SIVpbj株感染サル化マウスでは感染後2週以内に末梢血中でIL-6 mRNAの発現増加が見られたが、SIVB670株感染サル化マウスでは発現増加は認めなかった。in vitro実験系での解析より、

SIVB670 株感染サル細胞では IL-6mRNA は有意に発現増加するが、タンパク産生量の増加を認めないことがわかった。以上より、SIVPBj 株感染と SIVB670 株感染では IL-6mRNA の翻訳機構に違いがあり、このことが、SIV の感染病態の差異に影響を及ぼしていると考えられた。

【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】

○研究代表者：京都大学生命科学研究科　准教授　高原　和彦

○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、大学院生　旭　拓真

○研究成果：

重度の感染は強い炎症による致死的な敗血症を引き起こすことがある。一方で、病原体は宿主へ感染するために様々な炎症・免疫抑制機構を備えている。本研究では、この抑制機構を新たに敗血症の制御に応用することを目指した。具体的には、マウス LPS 誘導性敗血症モデルにおいて、カンジダ菌の細胞壁由来 N 型糖鎖が免疫抑制性サイトカイン IL-10 の産生を亢進し、敗血症に伴うサイトカインストームを抑制することで生存率を改善させることを見出した。

【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：准教授　大塚　俊之

○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群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、本年度、これらの細胞において抗 Neurog2 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。今後、この解析結果をもとに Neurog2 の発現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。

【AKT 活性化による神経変性疾患の理解】

○研究代表者：長浜バイオ大学バイオサイエンス学部　助教　阪上　起世

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授　大塚　俊之、教授　影山　龍一郎、
助教　小林　妙子、技術専門員　宮地　均

○研究成果：

Gt(Rosa)26Sor 遺伝子座に CAG プロモーター下に loxP-, frt-flanked STOP カセットと human AKT1 を挿入したノックインマウスの作製を CRISPR-Cas9 により行った。今回作製を行ったものは、野生型 human AKT1、活性型 AKT（myrAKT Δ PH）、不活性型 AKT（AKT1 3A: 179A, 308A, 473A）をそれぞれ発現する 3 系統で、現在系統化を進めている。

【A CRISPR-based reporter of Borna disease virus RNA-to-RNA, virus-to-host gene flow】

○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 generated knock-out mice that lack piRNA deriving ENLNs by using CRSPR/Cas system, and generated virus stocks for ongoing infection experiments. Also We injected BoDV-1 into the brains of knock-out mice.

【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】

◯研究代表者：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
教授　青木　一洋
◯ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授　望月　敦史
◯研究成果：

分裂酵母の細胞周期ネットワークに関して構造感度解析を行ったところ、複数の緩衝構造を有していることが明らかになった。つまりこの緩衝構造内の分子や活性の変動は構造の外には影響を及ぼさないことを示唆している。これを検証するために、分裂酵母に緩衝構造内の分子や活性を増減させるシステムと緩衝構造外の分子の変動を可視化するシステムを導入した。現在、これらのシステムを組み込んだ分裂酵母株の生細胞イメージングを実施している。

ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点
2022 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2022 年 4 月～ 2023 年 3 月）

①ウイルス感染研究

ウイルス感染研究として計 7 件の研究を行った。

【SARS-CoV-2 を制御する中和抗体開発に向けた分子基盤の解明】

○研究代表者：北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室
教授　前仲　勝実
○医生物学研究所共同研究者：ウイルス制御分野　教授　橋口　隆生
○研究成果：

精製 Spike 蛋白質を活用して、生物物理学的解析や構造生物学的解析を取り入れた治療薬候補分子の絞込や標的蛋白質の詳細な解析を行った。オミクロン株を含む多くの SARS-CoV-2 変異株に対して高い中和活性を持つヒト抗体を取得して、その作用機序を構造解析により詳細に解明した。また BA.2.75 株の ACE2 受容体認識機構の解明に成功した。

【COVID-19 における新型コロナウイルス S 蛋白特異的 T 細胞の解析】

○研究代表者：京都大学大学院医学研究科免疫細胞生物学　教授　上野　英樹
○医生物学研究所共同研究者：ウイルス制御分野　教授　橋口　隆生

【Molecular mechanisms of RNA biosynthesis by Borna disease virus RNA polymerase】

○研究代表者：University of Toledo Associate Professor Tomoaki Ogino
○医生物学研究所共同研究者：RNA ウイルス分野　教授　朝長　啓造

【ウイルス侵入受容体膜タンパク質および関連複合体のクライオ電子顕微鏡構造研究】

○研究代表者：京都大学大学院医学研究科　准教授　野村　紀通
○医生物学研究所共同研究者：微細構造ウイルス分野　教授　野田　岳志
○研究成果：

B 型肝炎ウイルス感染受容体 NTCP の構造を世界で初めて解像した。ウイルスとの高親和性結合に重要な NTCP の残基の配置を立体構造上でマッピングし、感染制御・抗ウイルス薬開発に向けての基盤を築いた。成果は Nature 誌にて発表した。他に新型コロナウイルスの M タンパク質の構造を解明し、Nature Communications 誌に発表した。微細構造ウイルス学分野の最先端クライオ電子顕微鏡を活用して研究を推進した。

【新規末梢循環型 iNKT 細胞の同定と抗腫瘍・抗ウイルス免疫機能の解明】

○研究代表者：理化学研究所生命機能科学研究センター細胞システム動態予測研究チーム
チームリーダー　城口　克之

○医生物学研究所共同研究者：免疫制御分野　教授　生田　宏一
○研究成果：
本研究では iNKT 細胞の不均一性に注目し、新たに CD244+CXCR6+（C2）iNKT 細胞を同定した。細胞特異的 IL-15 欠損マウス、網羅的遺伝子発現解析、細胞動態解析などにより、従来の組織常在型 iNKT 細胞と異なり、胸腺 IL-15 に依存して分化する C2 iNKT 細胞が循環型細胞であり、抗腫瘍免疫と抗ウイルス免疫において極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。

【加齢に伴い破綻する新規グループ１自然リンパ球の機能と制御機構の解明】
○研究代表者：京都大学大学院医学研究科　准教授　吉富　啓之
○医生物学研究所共同研究者：免疫制御分野　教授　生田　宏一
○研究成果：
ILC1 の不均一性に注目し、マウス肝臓内の ILC1 を従来型の IL-7R 陽性 ILC1 と新たに見出した IL-7R 陰性 ILC1 に分画した。まず、IL-7R 陰性 ILC1 が肝細胞由来の IL-15 に依存して維持されることを明らかにした。次に、scRNA-seq データの再解析から、マウス IL-7R 陰性 ILC1 と性質が完全に一致するヒト ILC1 分画は存在せず、マウスに特異的な集団であることが示唆された。

【サルエイズモデルにおける CTL の腸管感染防御能に関する研究】
○研究代表者：国立感染症研究所エイズ研究センター　センター長　俣野　哲朗
○医生物学研究所共同研究者：霊長類モデル分野　准教授　三浦　智行
○研究成果：
これまでの研究を発展させ、SIV Gag/Vif 断片連結抗原発現 SeV ベクターワクチン接種後の SIV 経直腸チャレンジで防御効果が認められたサルの解析を継続し、感染防御効果を確認した。本研究結果は、多様性の高い Env 抗原を用いない HIV ワクチンで初めて粘膜感染防御効果を示したものとして重要な成果である。一方、SIV 感染慢性期の ART 下における iPS 由来 CTL 細胞接種実験を行い、感染免疫動態に関するデータを得た。

②幹細胞・組織再生研究
幹細胞・組織再生研究として計 9 件の研究を行った。

【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：滋賀医科大学生化学・分子生物学講座　教授　縣　保年
○医生物学研究所共同研究者：再生免疫学分野　教授　河本　宏

【MAIT 細胞を利用した新規がん治療法の開発】
○研究代表者：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
教授　若尾　宏
○医生物学研究所共同研究者：再生免疫学分野　教授　河本　宏

○研究成果：

マウス MAIT 細胞由来 iPS 細胞（MAIT-iPS 細胞）に卵白オバルミン（OVA）を認識するキメラ抗原受容体（CAR）を遺伝子導入し、ここから CAR を発現する CAR-reMAIT 細胞を分化誘導した。また、ヒト MAIT 細胞由来 iPS 細胞にヒト膵臓がんに特異的であるとされる CEACAM7 を認識する CAR を遺伝子導入し、CAR-reMAIT 細胞の分化誘導を試みた。

【組織形成過程における生体リズム制御系の機能発生学的解析】

○研究代表者：京都府立医科大学大学院医学研究科　教授　八木田　和弘

○医生物学研究所共同研究者：統合生体プロセス分野　教授　近藤　玄

○研究成果：

哺乳類の個体発生過程において、概日時計振動が抑制されている発生初期から中期にかけてもう一つの生物時計である分節時計（体節時計）が機能している。我々は、概日時計と分節時計の相互作用について検討し、概日時計の振動機構が体節形成リズムに干渉し阻害する可能性を示した。本研究は、哺乳類発生過程に現れる二つの生物時計の関係性を初めて明らかにしたもので、発生学に新しい視点を提供した。

【造血幹細胞ニッチの変容と再生の分子機構の解明】

○研究代表者：大阪大学大学院生命機能研究科　教授　長澤　丘司

○医生物学研究所共同研究者：統合生体プロセス分野　教授　近藤　玄

○研究成果：

これまでの共同研究により、CAR 細胞が造血幹細胞ニッチの主要な構成細胞であることや、CAR 細胞に必須の転写因子 Foxc1、Ebf3/1 を明らかにしてきた。今回、新たに転写因子 Runx1/2 が CAR 細胞に高発現することを見出し、CAR 細胞のニッチとしての機能維持に必須であり、特に骨髄の線維化を抑制していることを明らかにした（Omatsu et al., Nat. Commun. 2022）。

【炎症環境におけ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：京都大学大学院医学研究科　教授　竹内　理

○医生物学研究所共同研究者：附属再生実験動物施設　助教　渡邊　仁美

【配向制御型 3 次元細胞培養システムを利用した筋･腱複合組織の作製と筋―腱接合部形成機構の解明】

○研究代表者：広島大学大学院統合生命科学研究科　助教　高橋　治子

○医生物学研究所共同研究者：発生システム制御分野　教授　永樂　元次

【How aberrant innate immunity facilitates arising cancer stem cells】

○研究代表者：North Carolina State University Professor Jun Ninomiya-Tsuji

○医生物学研究所共同研究者：がん・幹細胞シグナル分野　教授　伊藤　貴浩

【連続切片電子顕微鏡画像撮影と深層学習を用いたオルガネラ間接触がマウス成体神経幹細胞の運命制御に果たす役割の解明】

○研究代表者：東京大学大学院工学系研究科　准教授　平林　祐介

○医生物学研究所共同研究者：幹細胞デコンストラクション分野　教授　今吉　格

【ヒト ES 細胞と光操作技術による心臓発生と拍動制御機構の解明】

○研究代表者：国立研究開発法人産業技術総合研究所健康医工学研究部門
　研究員　森川　久未

○医生物学研究所共同研究者：臨床基盤分野　准教授　川瀬　栄八郎

③生命システム研究

　生命システム研究として計 14 件の研究を行った。

【アミノ酸シグナルによる運動神経細胞の恒常性維持機構の解明に関する研究】

○研究代表者：岐阜薬科大学薬学部　教授　檜井　栄一

○医生物学研究所共同研究者：RNA ウイルス分野　助教　北畠　真

【リポソームに再構成した Ib 膜孔のクライオ電子顕微鏡による構造解析】

○研究代表者：京都産業大学生命科学部　教授　津下　英明

○医生物学研究所共同研究者：微細構造ウイルス分野　教授　野田　岳志

【Aire 欠損マウスを用いた自己免疫病態の解析】

○研究代表者：徳島大学先端酵素学研究所免疫病態学分野　教授　松本　満

○医生物学研究所共同研究者：再生免疫学分野　教授　河本　宏

【血液細胞の進化的起源の追究】

○研究代表者：県立広島大学生物資源科学部生命環境学科　教授　菅　裕

○医生物学研究所共同研究者：再生免疫学分野　教授　河本　宏

○研究成果：

　カプサスポラから哺乳類にいたるまで、マクロファージ様の細胞では、転写因子 CEBPa が高発現していることが明らかとなり、また、カプサスポラの CEBPa もマウスの CEBPa と類似した機能を呈することがマウス細胞を用いた実験で明らかとなった。また、カプサスポラでの CEBPa の強制発現実験も行い、核内で選択的に発現されていることを確認した。CEBPa ノックアウト実験も進行中である。

【皮膚・毛包におけるタイトジャンクションタンパク質 Claudin の役割】

○研究代表者：帝京大学先端総合研究機構　教授　月田　早智子

○医生物学研究所共同研究者：統合生体プロセス分野　教授　近藤　玄

【制御性Ｔ細胞の不均一性形成メカニズムの解明】

○研究代表者：東京大学大学院薬学系研究科　教授　堀　昌平

○医生物学研究所共同研究者：統合生体プロセス分野　准教授　廣田　圭司

○研究成果：

本研究では、Treg による肺の炎症抑制機能に紐付いた TCR クロノタイプについて解析を進めた。Th2 型 Treg に選択的に発現するクロノタイプが Foxp3 A384T 変異マウスにおける肺の Th2 型炎症を抑制する活性を Treg に賦与すること、Th1 型 Treg に選択的に発現するクロノタイプが Foxp3 と協調的に Th1 型 Treg への分化を促進する活性を賦与することを明らかにした。そして、これら 2 つのクロノタイプについて TCR トランスジェニックマウスを作製するためのベクターを構築した。

【線維軟骨性エンテーシスの組織構築・維持におけるメカノーシグナル連関機構の解明】

○研究代表者：広島大学大学院医系科学研究科　教授　宿南　知佐

○医生物学研究所共同研究者：バイオメカニクス分野　教授　安達　泰治

【骨代謝治療効果の in silico 分析統合基盤による薬剤新規効果の探究】

○研究代表者：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　教授　田中　栄

○医生物学研究所共同研究者：バイオメカニクス分野　教授　安達　泰治

【膜内プロテアーゼの構造・動態解析を基盤とした基質切断機構の解明】

○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

○医生物学研究所共同研究者：生体膜システム分野　教授　秋山　芳展

○研究成果：

大腸菌由来 RseP および海洋性細菌 K. koreensis 由来 RseP オルソログの X 線結晶構造解析および構造情報に基づく機能解析によって、活性中心を取り囲むように存在する膜表在性の PDZ C-terminal 領域や親水性の PDZ タンデム領域が基質取り込みの過程で構造変化する可能性が示された。構造変化の作用機序の検証のため、新たな結晶化条件の探索やクライオ電子顕微鏡による構造解析にも着手した。

【構造理論と蛍光イメージングを用いた細胞周期ネットワークの統合的理解】

○研究代表者：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
教授　青木　一洋

○医生物学研究所共同研究者：数理生物学分野　教授　望月　敦史

○研究成果：

分裂酵母の細胞周期ネットワークに関して構造感度解析を行ったところ、複数の緩衝構造を有し

ていることが明らかになった。つまりこの緩衝構造内の分子や活性の変動は構造の外には影響を及ぼさないことを示唆している。これを検証するために、分裂酵母に緩衝構造外の分子を過剰発現させ、理論からの予想通り、緩衝構造外の摂動は緩衝構造内に影響を及ぼさないことを蛍光相互相関分光法（FCCS）により確かめた。

【ヒト初期発生過程における協働的な遺伝子制御ネットワークの大規模推定】

○研究代表者：東京大学大学院新領域創成科学研究科　准教授　木立　尚孝

○医生物学研究所共同研究者：数理生物学分野　教授　望月　敦史

【遺伝学的スクリーニングによる DNA 損傷修復機構の分子機構解明と疾患標的遺伝子の探索】

○研究代表者：東京都医学総合研究所　副参事研究員　笹沼　博之

○医生物学研究所共同研究者：幹細胞遺伝学分野　教授　遊佐　宏介

【BRD9 スプライシング異常を利用した合成致死性分子の探索】

○研究代表者：神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター血液・腫瘍研究部
　部長　井上　大地

○医生物学研究所共同研究者：幹細胞遺伝学分野　助教　青木　一成

【新規多時点機能的神経回路標識法による大脳記憶痕跡の解析】

○研究代表者：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　教授　奥野　浩行

○医生物学研究所共同研究者：幹細胞デコンストラクション分野　教授　今吉　格

2022 年度共同研究課題一覧

ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点

①ウイルス感染研究

研究代表者	医生物学研究所 共同研究者	研究課題名
北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室 前仲　勝実　教授	ウイルス制御分野 橋口　隆生　教授	SARS-CoV-2 を制御する中和抗体開発に向けた分子基盤の解明
京都大学大学院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	COVID-19 における新型コロナウイルス S 蛋白特異的 T 細胞の解析
University of Toledo Associate Professor Tomoaki Ogino	RNA ウイルス分野 朝長　啓造　教授	Molecular mechanisms of RNA biosynthesis by Borna disease virus RNA polymerase
京都大学大学院医学研究科 野村　紀通　准教授	微細構造ウイルス分野 野田　岳志　教授	ウイルス侵入受容体膜タンパク質および関連複合体のクライオ電子顕微鏡構造研究
理化学研究所生命機能科学研究センター　細胞システム動態予測研究チーム 城口　克之　チームリーダー	免疫制御分野 生田　宏一　教授	新規末梢循環型 iNKT 細胞の同定と抗腫瘍･抗ウイルス免疫機能の解明
京都大学大学院医学研究科 吉富　啓之　准教授	免疫制御分野 生田　宏一　教授	加齢に伴い破綻する新規グループ 1 自然リンパ球の機能と制御機構の解明
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	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

② 幹細胞・組織再生研究

研究代表者	医生物学研究所 共同研究者	研究課題名
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
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	MAIT 細胞を利用した新規がん治療法の開発
京都府立医科大学大学院医学研究科 八木田　和弘　教授	統合生体プロセス分野 近藤　玄　教授	組織形成過程における生体リズム制御系の機能発生学的解析
大阪大学大学院生命機能研究科 長澤　丘司　教授	統合生体プロセス分野 近藤　玄　教授	造血幹細胞ニッチの変容と再生の分子機構の解明
京都大学大学院医学研究科 竹内　理　教授	附属再生実験動物施設 渡邊　仁美　助教	炎症環境における骨髄造血適応を制御する転写後制御機構の解明
広島大学大学院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	配向制御型 3 次元細胞培養システムを利用した筋･腱複合組織の作製と筋―腱接合部形成機構の解明
North Carolina State University Professor Jun Ninomiya-Tsuji	がん・幹細胞シグナル分野 伊藤　貴浩　教授	How aberrant innate immunity facilitates arising cancer stem cells

東京大学大学院工学系研究科 平林　祐介　准教授	幹細胞デコンストラクション分野 今吉　格　教授	連続切片電子顕微鏡画像撮影と深層学習を用いたオルガネラ間接触がマウス成体神経幹細胞の運命制御に果たす役割の解明
国立研究開発法人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	臨床基盤分野 川瀬　栄八郎　准教授	ヒト ES 細胞と光操作技術による心臓発生と拍動制御機構の解明

③生命システム研究

研究代表者	医生物学研究所 共同研究者	研究課題名
岐阜薬科大学薬学部 檜井　栄一　教授	RNA ウイルス分野 北畠　真　助教	アミノ酸シグナルによる運動神経細胞の恒常性維持機構の解明に関する研究
京都産業大学生命科学部 津下　英明　教授	微細構造ウイルス分野 野田　岳志　教授	リポソームに再構成した Ib 膜孔のクライオ電子顕微鏡による構造解析
徳島大学先端酵素学研究所免疫病態学分野 松本　満　教授	再生免疫学分野 河本　宏　教授	Aire 欠損マウスを用いた自己免疫病態の解析
県立広島大学生物資源科学部生命環境学科 菅　裕　教授	再生免疫学分野 河本　宏　教授	血液細胞の進化的起源の追究
帝京大学先端総合研究機構 月田　早智子　教授	統合生体プロセス分野 近藤　玄 教授	皮膚・毛包におけるタイトジャンクションタンパク質 Claudin の役割
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 細胞の不均一性形成メカニズムの解明
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	線維軟骨性エンテーシスの組織構築・維持におけるメカノーシグナル連関機構の解明
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	骨代謝治療効果の in silico 分析統合基盤による薬剤新規効果の探究
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	膜内プロテアーゼの構造・動態解析を基盤とした基質切断機構の解明
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	構造理論と蛍光イメージングを用いた細胞周期ネットワークの統合的理解
東京大学大学院新領域創成科学研究科 木立　尚孝　准教授	数理生物学分野 望月　敦史　教授	ヒト初期発生過程における協働的な遺伝子制御ネットワークの大規模推定
東京都医学総合研究所 笹沼　博之　副参事研究員	幹細胞遺伝学分野 遊佐　宏介　教授	遺伝学的スクリーニングによる DNA 損傷修復機構の分子機構解明と疾患標的遺伝子の探索
神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター血液・腫瘍研究部 井上　大地　部長	幹細胞遺伝学分野 青木　一成　助教	BRD9 スプライシング異常を利用した合成致死性分子の探索
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	新規多時点機能的神経回路標識法による大脳記憶痕跡の解析

学術集会

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
「ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点」
令和３年度共同研究報告会

開 催 日：2022 年 3 月 16 日（水）
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）
「SARS-CoV-2 蛋白質の性状解析と感染阻害抗体の開発」　前仲　勝実　教授（北海道大学大学院薬学研究院）
「ヒト iPS 細胞における SARS-CoV-2 感染・複製能の評価」　高山　和雄　講師（京都大学 iPS 細胞研究所）
「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」　宿南　知佐　教授（広島大学大学院医系科学研究科）
「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」　野村　紀通　准教授（京都大学大学院医学研究科）
「複合的手法による細菌型 S2P の立体構造解析」　禾　晃和　准教授（横浜市立大学・大学院生命医科学研究科）
「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」
磯村　恵美子（発表者：大阪大学大学院生 安部友大）講師（大阪大学歯学部附属病院口腔外科 1（制御系））
「骨格筋由来細胞外小胞の骨再生メカニズムの解明」　高藤　義正　助教（近畿大学医学部）
「幹細胞分化に関わる RNA 結合タンパク質の相分離性解析」　吉澤　拓也　助教（立命館大学生命科学部）
「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」　森川　久未　研究員（産業技術総合研究所健康医工学研究部門）
「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」
恒川　雄二　助教（東京大学医科学研究所遺伝子細胞治療センター）
「乳酸シグナル伝達経路の解明」　井上　徳光　教授（和歌山県立医科大学医学部）
「マウス単一エキソン型性決定因子 SRY-S 分解機構の解明」　立花　誠　教授（大阪大学大学院生命機能研究科）
「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―」
高橋　治子　助教（広島大学統合生命科学研究科）
「炎症環境における骨髄幹細胞系譜バイアスを制御する転写後制御機構の解明」
竹内　理（発表者：医学研究科　助教　植畑拓也）教授（京都大学大学院医学研究科）
「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」　長澤　丘司　教授（大阪大学大学院生命機能研究科）
「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」
堀　昌平　教授（東京大学大学院薬学系研究科）
「受精適期における精子選別機構の解明」　竹尾　透　教授（熊本大学生命資源研究・支援センター）
「常在収縮力計測による多能性幹細胞の分化状態評価」　出口　真次　教授（大阪大学大学院基礎工学研究科）
「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　教授（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（医））
「がん免疫における MAIT 細胞の機能解明」　若尾　宏　教授（獨協医科大学端医科学研究センター生体防御）
「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」　嘉島　相輝　助教（秋田大学医学部附属病院泌尿器科）
「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）
「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」　後藤　慎平　特定准教授（京都大学医学研究科）
「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（発表者：バイオメカニクス分野研究員 金英寛）教授（東京大学大学院医学系研究科外科学専攻）

「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」

月田　早智子（発表者：帝京大学准教授 田村淳）帝京大学教授（兼）大阪大学　特任教授
（帝京大学先端総合研究機構（兼）大阪大学大学院生命機能研究科）

「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」

山本　雅哉　教授（東北大学大学院工学研究科）

「Principles of chromatin nanomechanical dynamics and its role in transcription and stem cell identity」

Sara Wickström（発表者：バイオメカニクス分野助教 牧功一郎）Professor（Helsinki Institute of Life Science University of Helsinki）

「Elucidation of the molecular principle underlying the cellular sodium responses related to proinflammatory M1 macrophage function by genome-scale CRISPR knockout screening.」

Dominik N. Müller（発表者：Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Researcher 宮内英孝）Professor
（Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin）

「Towards the Understanding of Individual Roles of Different CAF Populations in the Progression of Human Hepatocellular Carcinoma」

Andrei Turtoi Team Leader（INSERM MONTPELLIER CANCER RESEARCH INSTITUTE）

医生物学研究所　第 16 回公開講演会

開 催 日：2022 年 7 月 9 日（土）
開催方法：京都大学百周年時計台記念館　百周年記念ホール

開会挨拶

「細胞の中から見える「幹細胞」と「がん」の共通性と固有性」　伊藤　貴浩（医生物学研究所　教授）

「生命システムを数理で解く－遺伝子と遺伝子の関係性を理詰めで考えると…。」　望月　敦史（医生物学研究所　教授）

分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演　　題	主催分野
2022. 2.16	西出　亮介 （東京大学大学院 総合文化研究科 広域科学専攻）	曲率により駆動される伝播パターン	数理生物学
2022. 3.23	今村　寿子 （九州大学大学院 医学研究院 系統解剖学分野）	植物細胞の成長に伴う形態形成モデル ～葉表皮細胞と根毛～	数理生物学
2022. 4.21	石川　雅人 （東京大学大学院 新領域創成科学研究科）	摂動後の発現時系列を用いた遺伝子制御ネットワーク推定法	数理生物学
2022. 5.20	Dr. Karan Gulati （JSPS Fellow, Institute for Life Sciences, Kyoto University;Group Leader, School of Dentistry, The University of Queensland）	Nano-Engineered Dental Implants	バイオメカニクス
2022. 7.13	下林　俊典 （京都大学 iPS 細胞研究所）	細胞内相分離パラダイムの創成 : 核生成と界面揺らぎ	数理生物学
2022. 7.25	Paulina Pawlica （Icahn School of Medicine at Mount Sinai, NY, USA）	ウイルス由来小分子 RNA と宿主の相互作用	RNA ウイルス
2022. 9.21	秋吉　一成 （京都大学大学院 工学研究科 高分子化学専攻 生体機能高分子研究室）	バイオ医薬品 DDS：ナノゲルを用いたワクチン開発	ウイルス制御
2022.10. 3	Alex Rigort （Product Marketing Manager, Thermo Fisher Scientific）	クライオ電子顕微鏡法の新展開：クライオ電子線トモグラフィーによる構造解析ソリューション	微細構造ウイルス学
2022.10.11	松崎　文雄 （理化学研究所 生命機能科学研究センター 非対称細胞分裂研究チーム）	細胞極性の再構成：細胞表層における極性複合体の動的な部分濡れ状態	数理生物学
2022.11.14	Johannes M. Dijkstra 博士 （藤田医科大学 医科学研究センター 准教授　Assoc. Prof., Center for Medical Science, Fujita Health University）	The evolution of interleukins 2, 15, and 15-like, an ancient family of cytokines involved in lymphocyte activation	免疫制御
2022.11.15	Dr. Stephen Dalton （Professor and Global STEM Scholar School of Biomedical Sciences Faculty of Medicine Chinese University of Hong Kong）	DEVELOPING NEW THERAPIES FOR TYPE 2 DIABETES USING hPSC-DERIVED BROWN AND BEIGE ADIPOCYTES	がん・幹細胞シグナル
2022.12.13	Ryo Morimoto （Dept. Developmental Immunology, Max Planck Institute of Immunology and Epigenetics, Germany ）	The evolution of adaptive immunity. A lesson from lamprey. Cytidine deaminase-based anticipatory antigen receptor assembly in jawless vertebrate.	再生免疫学
2022.12.13	黒田　大祐 （国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター 主任研究官）	情報技術を用いた抗体の進化と分子設計に関する研究	ウイルス制御
2022.12.15	Reika Watanabe （Staff Scientist, La Jolla Institute for Immunology, CA, USA）	Visualization of intracellular Ebola virus replication by in site cryo-electron tomography	微細構造ウイルス学
2022.12.19	荻野　朝朗 （College of Medicine and Life Sciences, University of Toledo, OH USA）	モノネガウイルスの mRNA 生合成機構	RNA ウイルス

開催日	講演者・所属	演　　題	主催分野
2022.12.21	Takafumi Kato （Research Associate, Department of Biochemistry, University of Oxford, UK）	クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析、その実例と小型膜タンパク質の戦略に関して	微細構造ウイルス学
2023. 2.14	Hui-Wen Chen （National Taiwan University）	Antigenic Cross-Reactivity among SARS-CoV-2 and Animal Coronaviruses	RNA ウイルス
2023. 2.17	松岡　雅雄 （熊本大学 生命科学研究部 血液・膠原病・感染症内科学講座）	ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構：ウイルス研究所での 21 年間の研究成果	免疫制御
2023. 2.22	Jing-Yuan Chen （National Taiwan University）	Serological Diagnosis and Prevalence of Parrot Bornavirus Infection in Taiwan	RNA ウイルス
2023. 3.10	一條　遼 （京都大学 医生物学研究所）	若手研究者による大型外部資金獲得	組織恒常性システム
2023. 3.10	杉田　征彦 （京都大学 医生物学研究所）	若手研究者による大型外部資金獲得	微細構造ウイルス学

構成員名簿

◆京都大学医生物学研究所教職員等◆

所長（兼）：河　本　　宏　　副所長（兼）：朝　長　啓　造，安　達　泰　治

◆京都大学医生物学研究所諮問会議◆

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）
竹　内　　理（京都大学大学院医学研究科教授）
鈴　木　基　史（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）
河　本　　宏（医生物学研究所所長）
朝　長　啓　造（医生物学研究所副所長）
安　達　泰　治（医生物学研究所副所長）

◆京都大学医生物学研究所運営委員会◆

＜ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点＞

川　口　　寧（東京大学医科学研究所教授）
坂　口　志　文（大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任教授）
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）
月　田　早智子（帝京大学先端総合研究機構教授）
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）
眞　貝　洋　一（理化学研究所主任研究員）
竹　内　　理（京都大学大学院医学研究科教授）
朝　長　啓　造（京都大学医生物学研究所教授）
安　達　泰　治（京都大学医生物学研究所教授）
近　藤　　玄（京都大学医生物学研究所教授）
豊　島　文　子（京都大学医生物学研究所教授）
野　田　岳　志（京都大学医生物学研究所教授）
永　樂　元　次（京都大学医生物学研究所教授）

■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，佐藤裕真，木村香菜子

＜ RNA ウイルス分野＞

教授：朝長啓造　　准教授：牧野晶子　　助教：北畠　真　　特定助教：小森園亮
特定職員：山下はるか　　研究員（非常勤）：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　　准教授：杉田征彦　　助教：中野雅博，村本裕紀子

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，森　瑞希，宗像　悟，加々尾萌絵

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

＜応答解析分野＞

客員教授：宮脇敦史　　客員准教授：Adrian Walton Moore　　特定准教授：磯村彰宏

＜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

大学院生：袁　熙敏　　研究生：服部德哉

＜生体材料学分野＞

教授：田畑泰彦　　助教：安藤　満

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：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，南光太郎，橋本磨熙，栃谷魁人，Yang Wenxuan，中村直人　　研究生：鈴木貴久

学部生：東　承吾，石井健登，森山敬介

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，永野誠治　　特定准教授：河岡慎平

特定助教：上堀淳二，小林由佳，澄田裕美，長畑洋佑，小西理予

特定研究員：加藤雄真，宮崎和子，西村有史，岸本加恵

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，橋本佳奈枝　　大学院生：高　宇嫻，板原多勇，周　浩洋，貝谷亮太

共同研究者：嘉島相輝　　特別研究学生：古谷竜男，Don Pietro Saldajeno　　民間等共同研究員：瀬和敬子，福永淳一

＜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＞

連携教授：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＞

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

＜病因免疫学分野＞

教授：伊藤能永

＜生体再建学分野＞

客員教授：坂口志文　　特定助教：川上竜司

特定研究員：伊藤寿宏，藤本七恵　　研究員（非常勤）：坂口教子，藤本秀子，畑　まゆ

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

＜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，仲尾信彦　　技術補佐員：平良美智代　　事務補佐員：森山友紀恵

外国人共同研究者：Karan Gulati，Jorge Gutierrez Gil，Anton Stoiber

短期交流学生：Lauren Korsnick

大学院生：横山優花，福手淳平，吉本昴希，末竹崇志，澤田　剛，鈴木龍之介，竹本裕也，直原舞子，

宅　雄大，大久保遼太郎，杉本浩太郎，花谷一圭，増山　諒，武藤剛嗣

学部生：今西　直，上平拓夢，Zhixin Zou，濱崎彩葉，後藤陽樹，Shreshth Sapra，宮本和季，島　優一郎

＜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（ASHBi 特定助教）：堤　璃水

民間等共同研究員：上杉佳子

共同研究者：田宮寛之　　大学院生：WANG ZHE，各務将矢，羽田早織，山口雄大，KANG JIHOON，小田裕介，熊谷曹世，

中野玲衣，SUN TONGZENG

学部生：荻原龍馬，高木里奈，TU AIKE，前田梨花

＜ RNA システム分野＞

助教：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，黒瀬　蓮，田中克基

大学院生：三宅拓也，横山達彦，小林達也，池田優希，山田高暉　　研究生：李　明

＜組織恒常性システム分野＞

教授：豊島文子　　助教：石橋理基，一條　遼，小林芳彦

技術補佐員：牧　律子，田村想来　　特定研究員：吉川万紀，上月智司　　事務補佐員：原田洋子

大学院生：阿部浩太，朴　龍鶴

＜数理生物学分野＞

教授：望月敦史　　特定准教授：岡田　崇，境　祐二　　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，YongJin Huang

＜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，宮内英孝

教務補佐員：杉野成一，髙野万里子　　事務補佐員：大段有美子　　大学院生：Raghda Khatab，Shafiqul Islam，日向瑞貴

＜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　　特定研究員：柳沢　誠，HSU Myriam

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）：赤井絹香，北村友理枝

派遣職員（事務補佐員）：片岡みわこ

＜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：坂本雅行（生命科学研究科），GUY Adam（生命科学研究科）

特定准教授：山田真弓　　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），加藤　悠（生命科学研究科）

技術補佐員：倉橋むつみ（生命科学研究科）　　特定職員：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），CHEN Linchi（生命科学研究科），

HUANG Mei-Lun（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），

HUANG Xianyue（生命科学研究科），CHEN Hedan（生命科学研究科），ZHENG Yicheng（生命科学研究科），

大鹿剛史（生命科学研究科），呉村和樹（生命科学研究科），趙　彗仁（生命科学研究科），永野郁美（生命科学研究科），

東島いずみ（生命科学研究科），松本愛莉（生命科学研究科），MA Chaorui（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，木庭一美　　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，渡辺隆司，木村智洋

■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，志田壽利　　特定研究員：島崎奈津子

教務補佐員：大附　舞

大学院生：張　原銘，王　梓涵，趙　庚鶴

＜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，俣野真帆

技術職員：渋谷　翔　　特定職員：竹中　慎　　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，宮田将史

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　　特定研究員：藤垣静香

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）　　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）　　特定助教：小西理予（兼）

・ES 細胞分化技術開発グループ

教授：遊佐宏介（兼）

■事務部■

事務長：藤井稔久　　総務掛長：原　彰子　　主任：中村美由紀　　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　　事務補佐員：谷山佳奈美　　派遣職員：稲垣きよみ，中村　望

Annual Report
of the Institute for Life and Medical Sciences,
Kyoto University
Vol.7 2022

2024 年 3 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 Life and Medical Sciences
Kyoto University