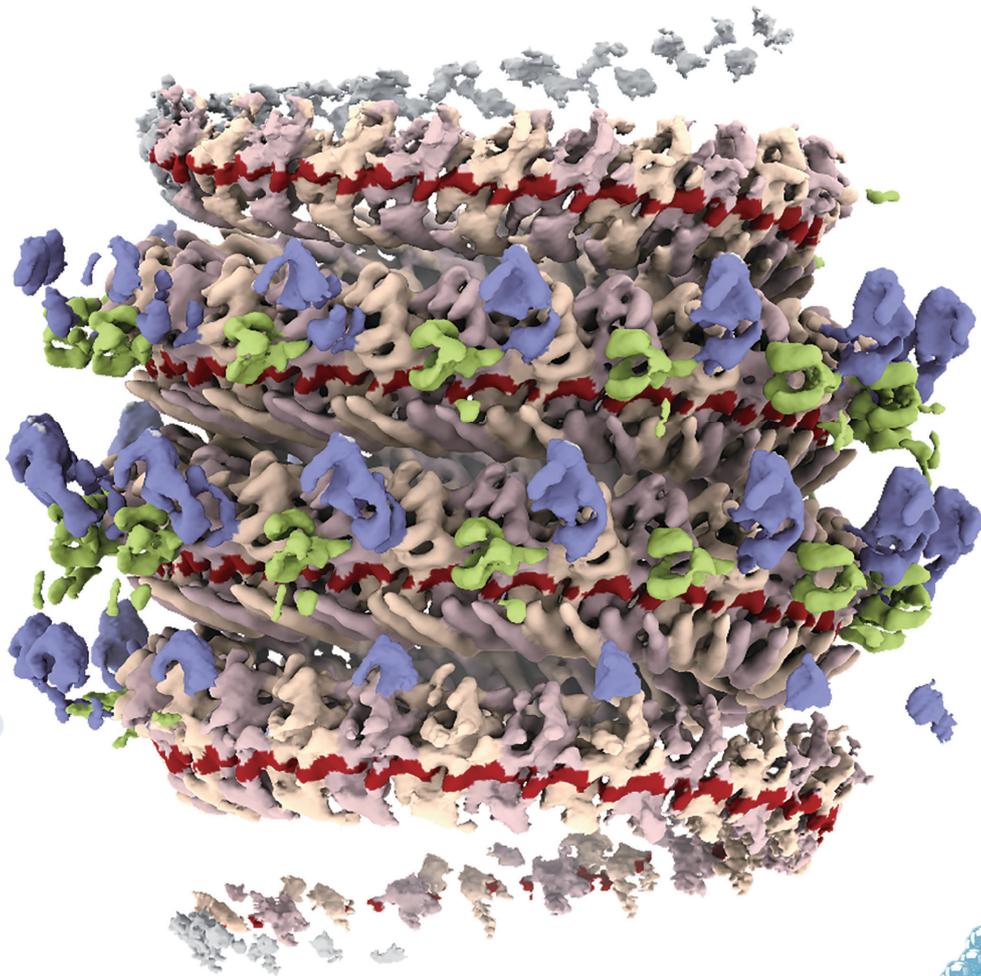
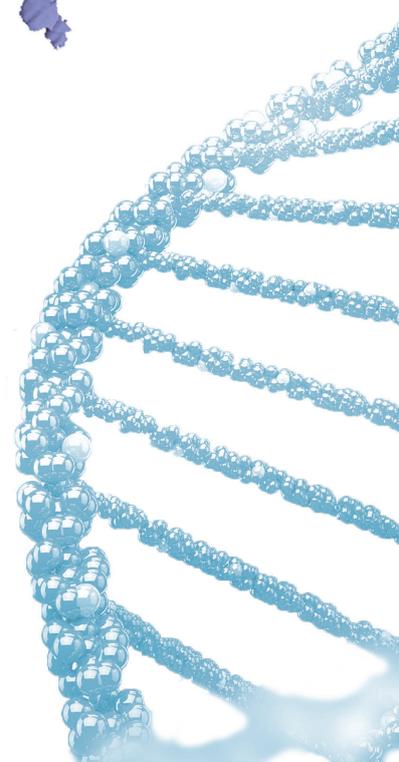


Annual Report

of the Institute for
Life and Medical Sciences
Kyoto University Vol. 9 2024



京都大学医生物学研究所年報



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

Vol.9 2024

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

表紙：

クライオ電子顕微鏡で決定したエボラウイルスの螺旋状ヌcleoカプシドの分子構造。
2分子の NP-RNA 複合体に2分子の VP24 が異なる向きで結合し、螺旋構造を形成している。
ページュ： nucleoprotein、赤： RNA、紫・黄緑：2分子の VP24

Cover:

Structure of Ebola virus helical nucleocapsid determined by cryoelectrn microscopy.
Two VP24 molecules bind to two NP-RNA complexes in different orientations, forming the helical nucleocapsid.
Beige: nucleoprotein; red: RNA; purple and light green: two VP24 molecules.

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

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	23
再生免疫学分野 Laboratory of Immunology	28
臓器連関研究チーム Inter-Organ Communication Research Team	34
発生エピゲノム研究分野 Laboratory of Developmental Epigenome	39
統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science	41
病因免疫学分野 Laboratory of Immunopathogenesis	46
生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology	49

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	54
発生システム制御分野 Laboratory of Developmental Systems	63
生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System	67
組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis	72
数理生物学分野 Laboratory of Mathematical Biology	76
幹細胞遺伝学分野 Laboratory of Stem Cell Genetics	80
がん・幹細胞シグナル分野 Laboratory of Cell Fate Dynamics & Therapeutics	85
幹細胞デコンストラクション分野 Laboratory of Deconstruction of Stem Cells	91
ナノ生物工学分野 Laboratory of Nano Bioengineering	94
老化感染制御学分野 Laboratory of Aging and Infection Control	101
メカノセンシング生理学分野 Laboratory of Mechanosensory Physiology	105
情報制御分野 Laboratory of Regulatory Information	107

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	110
マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team	113

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

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 Division of Clinical Bases for ES Cell Research	118
--	-----

共同研究	122
学術集会	132
分野主催のセミナー	135
構成員名簿	138

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。2024年においても、昨年引き続き 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、麻疹ウイルスや SARS-CoV-2 に対する阻害剤のデザインおよび同定に成功した。

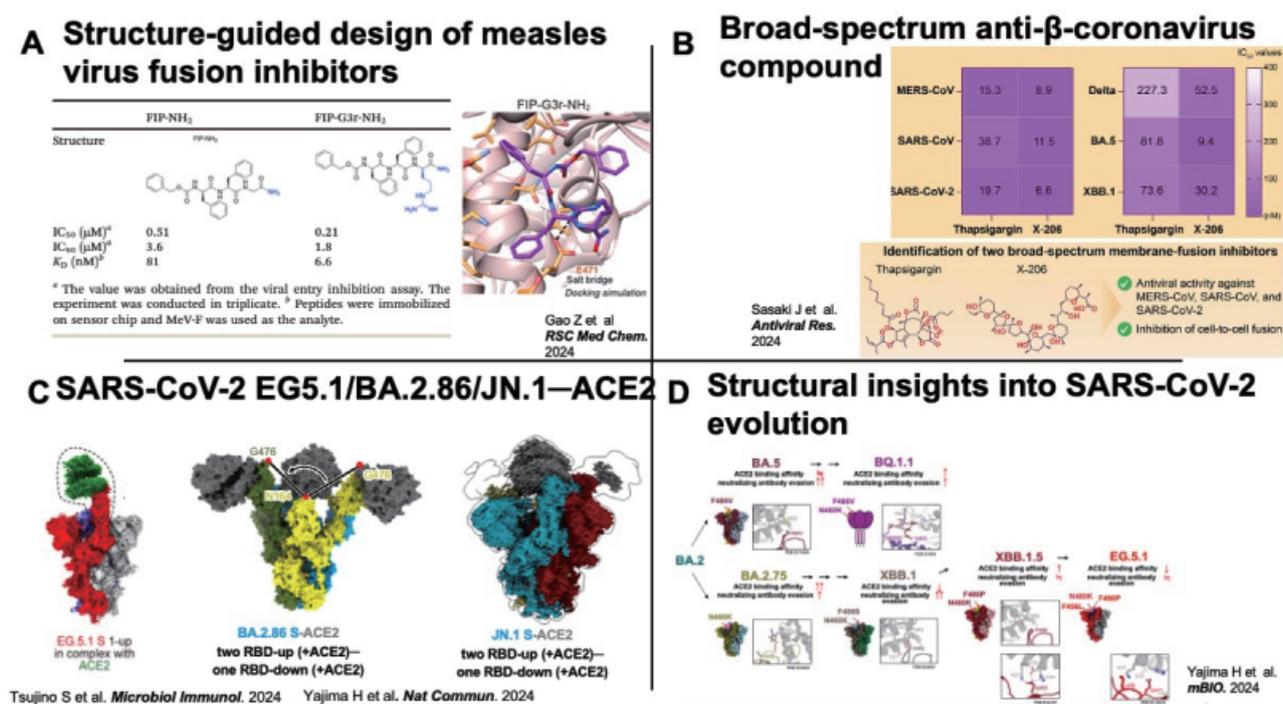
1) 麻疹ウイルスと SARS-CoV-2 に対する阻害剤のデザインおよび同定

ウイルス粒子表面にある糖蛋白質（麻疹ウイルス：F 蛋白質，SARS-CoV-2: Spike (S) 蛋白質）は、ウイルスと受容体の結合および膜融合を担っており、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。ウイルス糖蛋白質を標的に、構造情報を活用した阻害剤のデザインや広域抗ウイルス活性を示す化合物を同定することは、感染制御に貢献できる。そこで、2024年においては、麻疹ウイルス F 蛋白質の構造情報を活用して、膜融合阻害剤のデザインを行い、0.2 μM の IC_{50} を示す膜融合阻害剤を作製することに成功した (**Fig. 1A**)。作用機序として、F 蛋白質を prefusion 型に保ち熱安定性を高めることが確認された。SARS-CoV や MERS-CoV、SARS-CoV-2 を含む β コロナウイルスに対して広域な抗ウイルス活性を示す X-206 の同定にも成功した (**Fig. 1B**)。MERS-CoV の S 蛋白質の構造情報を活用して *in silico* で選抜した化合物群から、当該化合物が同定され、その作用機序として、高濃度では膜融合活性阻害が、低濃度ではウイルス複製阻害が確認され、少なくとも2つの異なる作用機序を示すことが確認された。その他、SARS-CoV-2 に対する複数の広域中和抗体の構造解析を行い、作用機序の詳細を解明した。

2) SARS-CoV-2 変異株に対応した病原性研究

COVID-19 を引き起こす病原体である SARS-CoV-2 は、変異を繰り返し世界中で流行の波を形成してきた。すなわち、SARS-CoV-2 は ACE2 受容体認識能や中和抗体逃避能が変異株ごとに変化し

ている。そこで、2024 年においても昨年に引き続き、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解明する研究を行った。これまでの研究から、抗体逃避能を高める方向に進化した BA.5 (F486V の変異獲得など) や ACE2 受容体結合能と抗体逃避能をともに高めた BA.2.75 (N460K の変異獲得など) を報告している。今回解析を行った EG.5.1 や BA.2.86, JN.1 において、特に BA.2.86/JN.1 系統は、XBB.1.5 と比較して 39 箇所以上のアミノ酸を獲得し、抗体逃避性や RBD の可動性が亢進していることが確認された。さらに、BA.2.86/JN.1 S-ACE2 複合体構造において、RBD が down の状態でも ACE2 受容体が結合している構造が初めて確認され、受容体結合モチーフ (RBM) を露出させずに (抗体による RBM 認識を避けながら) ACE2 と結合する新たな受容体認識機構が確認された (Fig. 1C-D)。



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 prophylactic and therapeutic methods for viral diseases.

1) Design and Identification of Inhibitors Against Measles Virus and SARS-CoV-2

Glycoproteins on viral envelope (measles virus: F protein; SARS-CoV-2: Spike (S) protein) are responsible for virus-receptor binding and membrane fusion, playing crucial roles in determining host range and cellular/tissue tropism. Designing inhibitors using structural information and identifying compounds with broad

antiviral activity against viral glycoproteins can contribute to infection control. In 2024, we successfully designed membrane fusion inhibitors utilizing structural information of measles virus F protein, creating an inhibitor with an IC₅₀ of 0.2 μ M (Fig. 1A). The mechanism involves maintaining F protein in prefusion conformation and enhancing thermal stability. We also identified X-206, showing broad antiviral activity against β -coronaviruses including SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (Fig. 1B). This compound was identified from in silico screening using MERS-CoV S protein structural information, demonstrating dual mechanisms: membrane fusion inhibition at high concentrations and viral replication inhibition at low concentrations. Additionally, we performed structural analysis of multiple broadly neutralizing antibodies against SARS-CoV-2, elucidating detailed mechanisms of action.

2) Structural insights into pathogenicity of SARS-CoV-2 variants

SARS-CoV-2 has undergone multiple mutations leading to global waves of the pandemic. Consequently, SARS-CoV-2 has altered ACE2-receptor recognition ability and neutralizing-antibody evasion ability in each variant. Therefore, in 2024, we studied the structural basis for the evolution of ACE2 receptor binding and neutralizing antibody evasion ability of newly emerged SARS-CoV-2 variants by structural analysis. Notably, in the BA.2.86/JN.1 S-ACE2 complex structure, we first confirmed a structure where the ACE2 receptor binds even when the RBD is in the down conformation. This revealed a novel receptor recognition mechanism that allows ACE2 binding without exposing the receptor-binding motif (RBM), thereby avoiding RBM recognition by antibodies while maintaining receptor binding capability (Fig. 1C-D).

List of Publication

Tsujino S, Deguchi S, Nomai T, Padilla-Blanco M, Plianchaisuk A, Wang L, Begum MM, Uriu K, Mizuma K, Nao N, Kojima I, Tsubo T, Li J, Matsumura Y, Nagao M, Oda Y, Tsuda M, Anraku Y, Kita S, Yajima H, Sasaki-Tabata K, Guo Z, Hinay AA Jr, Yoshimatsu K, Yamamoto Y, Nagamoto T, Asakura H, Nagashima M, Sadamasu K, Yoshimura K, Nasser H, Jonathan M, Putri O, Kim Y, Chen L, Suzuki R, Tamura T, Maenaka K, Irie T, Matsuno K, Tanaka S, Ito J, Ikeda T, Takayama K, Zahradnik J, Hashiguchi T, Fukuhara T, Sato K; Genotype to Phenotype Japan (G2P - Japan) Consortium. (2024) Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron EG.5.1 variant. **Microbiol Immunol.** 68 (9):305-330.

Yajima H, Nomai T, Okumura K, Maenaka K; Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ito J, Hashiguchi T, Sato K. (2024) Molecular and structural insights into SARS-CoV-2 evolution: from BA.2 to XBB subvariants. **mBio.** e0322023.

Yajima H, Anraku Y, Kaku Y, Kimura KT, Plianchaisuk A, Okumura K, Nakada-Nakura Y, Atarashi Y, Hemmi T, Kuroda D, Takahashi Y, Kita S, Sasaki J, Sumita H; The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ito J, Maenaka K, Sato K, Hashiguchi T. (2024) Structural basis for receptor-binding

domain mobility of the spike in SARS-CoV-2 BA.2.86 and JN.1. **Nat Commun.** 15 (1):8574.

Sasaki J, Sato A, Sasaki M, Okabe I, Kodama K, Otsuguro S, Yasuda K, Kojima H, Orba Y, Sawa H, Maenaka K, Yanagi Y, Hashiguchi T. (2024) X-206 exhibits broad-spectrum anti-b-coronavirus activity, covering SARS-CoV-2 variants and drug-resistant isolates. **Antiviral research.** 232:106039.

Gao Z, Sasaki J, Suzuki T, Suzuki T, Miwa Y, Sando S, Hashiguchi T, Morimoto J. (2025) Discovery of potent measles virus fusion inhibitor peptides via structure-guided derivatization. **RSC Med Chem.** 24;16 (4):1619-1625.

List of Presentations

Hemmi T, Shirota R, Yajima H, Ishikawa S, Sugita Y, Ainai A, Noda T, Suzuki T, Hashiguchi T. Exploring COVID-19 vaccine immunogen design guidelines to improve the efficiency of broadly neutralizing antibody induction. **The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity.** Kyoto, Japan. Sep. 17-19. 2024.

Sasaki J, Ikegame S, Yoshitomi H, Ueno H, Hashiguchi T. The identification of escape mutant of MERS-CoV spike protein against neutralizing antibody using human-cultured cells. **The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity.** Kyoto, Japan. Sep. 17-19. 2024.

Hemmi T, Shirota R, Ishikawa S, Sugita Y, Ou I, Ainai A, Noda T, Suzuki T, Hashiguchi T. Exploring useful vaccine antigen by SARS-CoV-2 spike protein characterization and immunogenicity testing. **ISIRV OPTIONS for the Control of Influenza XII.** Brisbane, Australia. Sep. 29- Oct. 2. 2024.

Hemmi T, Shirota R. Yajima H, Ishikawa S, Sugita Y, Ainai A, Noda T, Suzuki T, Hashiguchi T. Exploring COVID-19 vaccine antigen design guidelines to improve the efficiency of broadly neutralizing antibody induction. **2024 International Society for Vaccines Annual Congress.** Seoul, Korea. Oct. 21-23. 2024.

Yajima H, Anraku Y, Kaku Y, Kimura TK, Plianchaisuk A, Okumura K, Nakada-Nakura Y, Atarashi Y, Hemmi T, Kuroda D, Takahashi Y, Kita S, Sasaki J, Sumita H, The Genotype to Phenotype Japan (G2P-Japan) Consortium; Ito J, Maenaka K, Sato K, Hashiguchi T. Structural insights into the mobility of receptor binding domain in SARS-CoV-2 BA.2.86 spike protein. **Preparing for the Next Pandemic: Evolution, Pathogenesis and Virology of Coronaviruses.** Japan. Dec. 2-5. 2024

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、2024年度は4月に大学院生命科学研究科修士課程1年として平松朋真と Luo, Wen-Ching が入学した。また非常勤研究員の酒井まどかが5月に特定助教、3月に助教となった。8月には小森園亮が、3月には松郷宙倫が退職した。

以下に、2024年4月から2025年3月までに本分野から報告された2つの研究成果について概要を記載する。

(1) SARS-CoV-2 感染に重要な宿主因子の同定と EHMT1/2 阻害による治療効果に関する研究

SARS-CoV-2 が宿主細胞と相互作用する仕組みは未解明の点が多い。そこで本研究では、ヒト肺上皮細胞 A549-hACE2 において、ゲノム全域を標的とする CRISPR-Cas9 スクリーニングを実施し、感染誘導細胞死を指標にプロウイルス因子を探索した。その結果、TRIM28、TRIM33、およびヒストンリジンメチル基転移酵素 EHMT1/2 が SARS-CoV-2 複製に重要であることを見いだした。TRIM28 はウイルス粒子形成過程、TRIM33・EHMT1/2 はウイルス RNA の転写・複製段階に関与することが示唆された。特に EHMT1/2 の酵素活性特異的阻害剤 UNC0642 は、*in vitro* でウイルス増殖を 10^6 倍以上抑制し、シリアンハムスター感染モデルでも肺内ウイルス量および病理スコアを有意に低下させた。本成果は、SARS-CoV-2 制御における新規宿主標的の理解を深めるとともに、EHMT1/2 阻害薬を基盤とした抗ウイルス治療戦略の開発に重要な知見を提供する。

(2) ボルナ病ウイルスの細胞侵入機構と感染性増強に関する研究

ボルナ病ウイルス 1 (BoDV-1) は、ヒトを含む哺乳動物に急性致死性脳炎を引き起こす病原体である。しかし、BoDV-1 は感染性ウイルス粒子の産生量が非常に低く、また細胞に感染しても明確な細胞変性効果を示さないことから、その細胞侵入メカニズムに関する研究は長らく困難を極めてきた。我々はこの問題を解決するため、BoDV-1 を含むボルナウイルス属 (Orthobornavirus) の糖タンパク質 (G) を用いて擬似型水疱性口内炎ウイルス (VSV) を効率良く作製する手法を新たに確立した。この方法により、擬似型ウイルスの感染力価を大幅に向上させるためには、G タンパク質

の発現量を最適化することが重要であることを明らかにした。特に、ヒト由来株 huP2br の G タンパク質を用いた場合の感染力価は、従来の標準株である He/80 株より顕著に高かった。さらに変異解析により、BoDV-1 の G タンパク質における 307 番目のメチオニン残基が膜融合活性の制御に重要であり、この残基が存在することで幅広い pH 条件下でも高い膜融合能を示し、感染性の向上に中心的な役割を果たすことを示した。本研究成果は、これまで未解明であった BoDV-1 の細胞侵入機構の解明に重要な示唆を与えるものであり、また他のボルナウイルス属ウイルスを用いた擬似型 VSV 作製における感染性改善や、G タンパク質の機能ドメインのさらなる同定にも大きく寄与するものである。

In academic year 2024, Hoshin Hiramatsu and Luo, Wen-Ching enrolled as first-year Master's students in the Graduate School of Biostudies in April. And Madoka Sakai, a Part-time researcher, became a Program-Specific Assistant Professor in May, and then became an Assistant Professor in March. In August and March, Ryo Komorizono and Hiromichi Matsugo, respectively, transferred to other universities.

Below, we provide an overview of two research achievements reported by our laboratory from April 2024 to March 2025:

(1) Identification of Host Factors Involved in SARS-CoV-2 Infection and Therapeutic Inhibition of EHMT1/2

The mechanisms by which SARS-CoV-2 exploits host cells remain incompletely defined. To address this, we performed a genome-wide CRISPR–Cas9 loss-of-function screen in A549-hACE2 cells, using infection-induced cell death as a read-out. The screen pinpointed TRIM28, TRIM33 and the lysine methyltransferases EHMT1/2 as critical proviral factors. Functional studies revealed that TRIM28 facilitates virion assembly, whereas TRIM33 and EHMT1/2 promote viral RNA transcription and replication. Strikingly, the selective EHMT1/2 inhibitor UNC0642 reduced viral yields by more than six orders of magnitude in cell culture and significantly lowered lung viral load and pathology scores in a Syrian hamster model. These findings illuminate previously unknown host determinants of SARS-CoV-2 replication and highlight EHMT1/2 inhibition as a promising avenue for antiviral intervention.

(2) Study on Cell Entry Mechanisms and Infectivity Enhancement of Borna Disease Virus

Borna disease virus 1 (BoDV-1) is a pathogen that causes acute fatal encephalitis in mammals, including humans. However, research into the cell entry mechanisms of BoDV-1 has been challenging due to extremely low production of infectious viral particles and a lack of cytopathic effects in infected cells. To address these issues, we developed a novel method to efficiently produce vesicular stomatitis virus (VSV) pseudotyped with the glycoprotein (G) from members of the genus Orthobornavirus, including BoDV-1. Using this approach, we found that optimizing the expression level of G protein is critical for significantly increasing the infectivity titer of the pseudotyped virus. Notably, VSV pseudotyped with the G protein derived from the

human isolate huP2br exhibited remarkably higher infectivity compared to the conventional He/80 strain. Furthermore, mutational analysis revealed that the methionine residue at position 307 in the BoDV-1 G protein is crucial for controlling membrane fusion activity, enabling high fusion efficiency over a broad pH range and playing a central role in enhancing infectivity. These findings provide important insights into the previously unresolved cell entry mechanism of BoDV-1 and substantially contribute to improving infectivity titers in VSV pseudotyping methods utilizing other Orthobornavirus glycoproteins, as well as facilitating further identification of functional domains within the G protein.

List of Publications

Fujii M, Ito S, Katsumata E, Chambers JK, Matsugo H, Takenaka-Uema A, Murakami S, Uchida K, Horimoto T. (2024). Japanese Encephalitis Virus and Schizophyllum commune Co-Infection in a Harbor Seal in Japan. *Veterinary Sciences*. 13;11 (5):215.

Sakai M, Masuda Y, Tarumoto Y, Aihara N, Tsunoda Y, Iwata M, Kamiya Y, Komorizono R, Noda T, Yusa K, Tomonaga K, Makino A. (2024). Genome-scale CRISPR-Cas9 screen identifies host factors as potential therapeutic targets for SARS-CoV-2 infection. *iScience*. 8;27 (8):110475.

Sekine W, Kamiki H, Ishida H, Matsugo H, Ohira K, Li K, Katayama M, Takenaka-Uema A, Murakami S, Horimoto T. (2024). Adaptation potential of H3N8 canine influenza virus in human respiratory cells. *Scientific Reports*. 13;14 (1):18750.

Akiba Y, Matsugo H, Kanda T, Sakai M, Makino A, Tomonaga K. (2024). A single amino acid substitution in the Borna disease virus glycoprotein enhances the infectivity titer of vesicular stomatitis virus pseudotyped virus by altering membrane fusion activity. *Microbiology and Immunology*. 68 (11):381-392.

Fujiwara C, Aihara N, Yoshino M, Shiga T, Fujino K, Komorizono R, Makino A, Tomonaga K, Soga R, Kamiie J. (2024). Distribution of lesions in psittacine birds naturally infected with parrot bornavirus in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1;86 (11):1110-1118.

Komorizono R, Yoshizumi S, Tomonaga K. (2024). Development of an RNA virus-based episomal vector with artificial aptazyme for gene silencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 18;108 (1):491.

Kitano M, Ohnishi H, Makino A, Miyamoto T, Hayashi Y, Mizuno K, Kaba S, Kawai Y, Kojima T, Kishimoto Y, Yamamoto N, Tomonaga K, Omori K. (2025). An Infection Model for SARS-CoV-2 Using Rat Transplanted with hiPSC-Airway Epithelial Cells. *Tissue Engineering - Part A*. 31 (9-10):361-372.

List of Presentations

Kanda T, Ogino M, Hattori S, Ogino T, Tomonaga K. Borna disease virus 1 employs the back-priming strategy to regulate viral RNA synthesis efficiency during infection. The 30th East Asia Biomedical

Research Joint Symposium. Taipei, Taiwan, October 29-31, 2024.

Akiba Y, Matsugo H, Kanda T, Sakai M, Makino A, Tomonaga K. A single amino acid substitution in the BoDV-1 G protein enhances the infectivity titer of VSV pseudotyped virus by altering membrane fusion activity. NTU Seminar. Taipei, Taiwan, December 12, 2024.

Kanda T, Tomonaga K. Back-priming regulates viral RNA synthesis efficiency of Borna disease virus 1. International symposium on Molecular Determinants of Zoonotic Viruses and Beyond. Freiburg, Germany, February 27 - March 1, 2025.

Matsugo H, Yusa K, Makino A, Tomonaga K. Role of ANP32 family proteins in Borna disease virus replication and host specificity. International symposium on Molecular Determinants of Zoonotic Viruses and Beyond. Freiburg, Germany, February 27 - March 1, 2025.

Sugita Y, Hirai Y, Goto S, Tomonaga K, Noda T, Horie M. Cryo-EM structures of Borna disease virus 1 RNA-free and RNA-bound nucleoprotein complex. International symposium on Molecular Determinants of Zoonotic Viruses and Beyond. Freiburg Germany, February 27 - March 1, 2025.

松郷宙倫. シュードタイプウイルスを用いたボルナ病ウイルスの細胞侵入に関わる宿主因子の同定. 第25回生命科学研究所シンポジウム. 京都, 2024年6月12日

Goto S, Hirai Y, Tomonaga K, Noda T, Horie M, Sugita Y. Cryo-EM structure of the Borna disease virus 1 RNA-free nucleoprotein complex. 第21回国際生物物理学会. 京都, 2024年6月24-28日

Kanda T, Tomonaga K. The 3' additional and promoter sequences of Borna disease virus 1 genome coordinately regulate viral transcription and replication. 第25回日本RNA学会年会. 東京, 2024年6月26-28日

Matsugo H, Yusa K, Makino A, Tomonaga K. ANP32A is a critical host factor for Borna disease virus replication and contributes to host tropism. 第25回日本RNA学会年会. 東京, 2024年6月26-28日

Wu MC, Komorizono R, Chen JY, Chou AA, Sakai M, Makino A, Kanda T, Chen HW, Tomonaga K. Development of a reverse genetics system that enables efficient recovery for various avian bornaviruses. 第18回ウイルス学キャンプ. 静岡, 2024年7月16日-17日

秋葉優沙, 松郷宙倫, 朝長啓造. BoDV-1の細胞侵入におけるGタンパク質膜融合活性の解析. 第18回ウイルス学キャンプ. 静岡, 2024年7月16日-17日

Kanda T, Ogino M, Hattori S, Ogino T, Tomonaga K. Back-priming: a unique RNA replication strategy of Borna disease virus 1. 第4回関西RNAクラブ. 大阪, 2024年8月27日

Kanda T, Ogino M, Hattori S, Ogino T, Tomonaga K. Back-priming: a unique RNA replication strategy of Borna disease virus 1. 2024年度京都大学医生物学研究所リトリート. 滋賀, 2024年9月2-3日

Matsugo H, Yusa K, Makino A, Tomonaga K. Genome-wide CRISPR screening for host factors involved in Borna disease virus infection. 2024年度京都大学医生物学研究所リトリート. 滋賀, 2024年9月2-3日

- Wu MC, Komorizono R, Chen JY, Chou AA, Sakai M, Makino A, Kanda T, Chen HW, Tomonaga K. Impacts of the clade-specific 5' UTR of viral mRNAs on host range in orthobornaviruses. 2024 年度京都大学医生物学研究所リトリート . 滋賀, 2024 年 9 月 2-3 日
- Akiba Y, Matsugo H, Tomonaga K. High membrane fusion activity of BoDV-1 G protein is required for highly infectious vesicular stomatitis virus pseudotyped virus. 2024 年度京都大学医生物学研究所リトリート . 滋賀, 2024 年 9 月 2-3 日
- Kanda T, Tomonaga K. Borna disease virus 1 employs the back-priming strategy to regulate viral RNA synthesis efficiency during infection. The 22nd Awaji international forum on infection and immunity. 京都, 2024 年 9 月 17-19 日
- Matsugo H, Yusa K, Makino A, Tomonaga K. Role of ANP32A in Borna disease virus replication and host specificity. The 22nd Awaji international forum on infection and immunity. 京都, 2024 年 9 月 17-19 日
- Sakai M, Ishikawa-Yamauchi Y, Makino A, Ogawa T, Tomonaga K. Establishment of an infection method of Borna disease virus in testis tissue. The 22nd Awaji international forum on infection and immunity. 京都, 2024 年 9 月 17-19 日
- Wu MC, Komorizono R, Chen JY, Chou AA, Sakai M, Makino A, Kanda T, Chen HW, Tomonaga K. Impacts of the Clade-Specific 5' UTR of Viral mRNAs on Host Range in Orthobornaviruse. The 22nd Awaji international forum on infection and immunity. 京都, 2024 年 9 月 17-19 日
- Goto S, Hirai Y, Tomonaga K, Noda T, Horie M, Sugita Y. Structure-based mutational analysis of Borna disease virus 1 nucleoprotein provides insights into N-RNA complex assembly process. The 22nd Awaji international forum on infection and immunity. 京都, 2024 年 9 月 17-19 日
- Hirai Y, Goto S, Tomonaga K, Noda T, Horie M, Sugita M. Structural insights into the Borna disease virus 1 nucleoprotein-RNA complex assembly via cryo-electron microscopy. The 22nd Awaji international forum on infection and immunity. 京都, 2024 年 9 月 17-19 日
- 神田雄大. ボルナ病ウイルスのゲノム複製機構に関する研究. 第 9 回関西ウイルスクラブ. 兵庫, 2024 年 10 月 14 日
- 朝長啓造. ボルナ病ウイルスを基盤とした革新的 RNA ウイルスベクター REVec の開発. シンポジウム「加速するウイルスベクター開発の最前線」, 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024 年 11 月 4-6 日
- 神田雄大, 小森園亮, 朝長啓造. ボルナ病ウイルス 1 感染細胞におけるアクセサリータンパク質 X の機能解析. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024 年 11 月 4-6 日
- 松郷宙倫, 遊佐宏介, 牧野晶子, 朝長啓造. ゲノムワイド CRISPR スクリーニングによるボルナウイルスの細胞侵入に関わる宿主因子の同定. 第 71 回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024 年 11 月 4-6 日

酒井まどか, 山内(石川)祐, 牧野晶子, 小川毅彦, 朝長啓造. 三次元培養精巢組織へのボルナ病ウイルスの感染系の確立. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024年11月4-6日

Wu MC, Komorizono R, Chen JY, Chou AA, Sakai M, Makino A, Kanda T, Chen HW, Tomonaga K. Impacts of the clade-specific 5' UTR of viral mRNAs on host range in orthobornaviruses. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024年11月4-6日

服部成喜, 神田雄大, 小森園亮, 朝長啓造. ボルナ病ウイルス1型ゲノムRNAとアンチゲノムRNAを高感度で検出するRT-qPCR法の確立. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024年11月4-6日

秋葉優沙, 松郷宙倫, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスGタンパク質の膜融合ループの同定. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024年11月4-6日

小森園亮, 朝長啓造. 一過性発現型ボルナウイルスベクターの開発とその応用. 第71回日本ウイルス学会学術集会. 愛知, 2024年11月4-6日

北野正之, 大西弘恵, 牧野晶子, 宮本達雄, 林泰之, 水野敬介, 椛慎治, 河合良隆, 児嶋剛, 岸本曜, 山本典生, 朝長啓造, 大森孝一. ヒトiPSC由来気道上皮細胞移植ヌードラットを用いたSARS-CoV-2感染モデルの作製. 第47回日本分子生物学会年会. 福岡, 2024年11月27-29日

藤原拓朗, 平林愛, 杉田征彦, 朝長啓造, 野田岳志. インフルエンザウイルスの核内複製機構の解明. 京都大学医学系研究科大学院教育支援機構ポスター発表会・研究交流会. 京都, 2024年11月29日

大西弘恵, 北野正之, 牧野晶子, 宮本達雄, 林泰之, 水野敬介, 椛慎治, 河合良隆, 児嶋剛, 岸本曜, 山本典生, 朝長啓造, 大森孝一. ヒトiPS細胞由来気道上皮細胞移植ラットを用いたSARS-CoV-2感染モデル作製への試み. 第24回日本再生医療学会総会. 横浜, 2025年3月20-22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	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。2024年度は、新型コロナウイルスの細胞内増殖を解析し、子孫ウイルスの細胞内輸送に関わる COPI の役割を解明した。また、エボラウイルスのヌクレオカプシドにおける NP-VP24-RNA 複合体の構造を決定し、VP24 による機能制御機構の分子構造基盤を解明した。

1) 新型コロナウイルスの細胞内輸送における COPI の機能解明

SARS-CoV-2 の子孫ウイルス粒子は、細胞内の小胞体-ゴルジ体中間区画 (ER-Golgi intermediate component: ERGIC) の内腔に出芽し、小胞輸送によって細胞表面へと輸送され、エクソサイトーシスにより細胞外に放出される。しかし、その分子メカニズムは十分に解明されていなかった。本研究では、アレイトモグラフィーや電子トモグラフィーなどの3次元電子顕微鏡解析を用いて、子孫ウイルス粒子を輸送する小胞にコートタンパク質が存在することを発見した (Fig. 1 矢頭)。さらに、免疫電子顕微鏡法により、そのコートタンパク質が COPI 複合体 (Coatomer complex I) であることを同定した。SARS-CoV-2 感染後期には、COPI と ERGIC の細胞内局在に顕著な変化が観察され、これらがウイルス増殖に関与している可能性が示唆された。そこで COPI の主要構成タンパク質である COPB2 の発現を抑制すると、子孫ウイルス粒子が ERGIC 内に停留することを電子顕微鏡解析で示した。さらに、子孫ウイルス粒子の細胞外への放出効率が有意に低下し、その結果、ウイルス増殖も有意に減少するこ

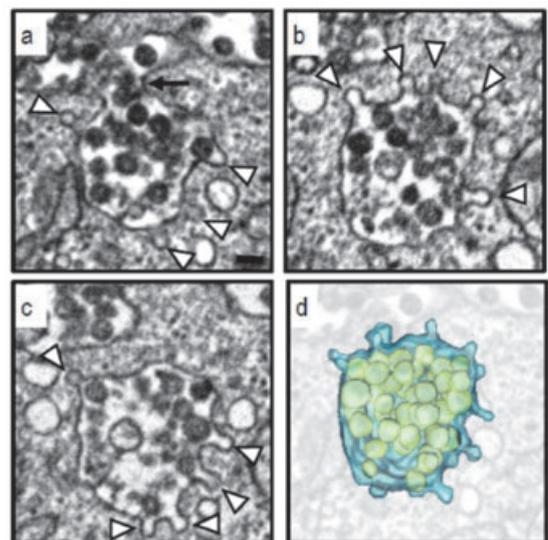


Fig. 1. Array tomography images of a COPI-coated vesicle containing progeny virions.

とを明らかにした。したがって、COPIがERGICからのSARS-CoV-2子孫ウイルス粒子の輸送を促進する上で重要な役割を果たしていることが明らかになった。

2) エボラウイルスのヌクレオカプシドの構造決定とVP24によるヌクレオカプシドの機能制御機構の解明

エボラウイルスは、重症出血熱を引き起こすウイルスであり、その細胞内増殖機構の解明は重要な課題である。ウイルス粒子の内部には、遺伝情報であるウイルスゲノムRNAの転写・複製、および次世代ウイルス粒子へのゲノムパッケージングを担うヌクレオカプシドが存在する。このヌクレオカプシドは、ウイルス核タンパク質(NP)とウイルスゲノムRNAの螺旋状複合体をコアとし、VP24やVP35といったウイルスタンパク質がコア構造に結合して構成される。特にVP24は、ウイルスゲノムRNA合成の抑制や、ヌクレオカプシドの細胞内輸送、感染性ウイルス粒子産生といった感染環の異なるステップに必須であることが知られていたが、ヌクレオカプシド上の詳細な構造および機能調節メカニズムは未解明であった。

本研究では、エボラウイルスのウイルス様粒子内のヌクレオカプシド様構造を、クライオ電子顕微鏡を用いて解析した。この構造解析により、螺旋状のヌクレオカプシドの基本的な繰り返し単位が、2つのNP分子と、それぞれ異なる向きで結合した2つのVP24分子で構成されることを明らかにした(Fig. 2)。また、得られた構造情報に基づき、NPとVP24間、およびVP24分子間の相互作用に関わる特定のアミノ酸に注目して解析を実施し、それぞれのVP24が、ウイルスのRNA合成・ヌクレオカプシドの組み立て・細胞内輸送および感染性ウイルス粒子産生といった、ヌクレオカプシドの多様な機能を制御する分子スイッチとしてはたらくことを明らかにした。本研究成果は、エボラウイルスの増殖メカニズムの理解を大きく進めるだけでなく、ウイルスの増殖を阻害する治療薬の開発に役立つものと期待される。

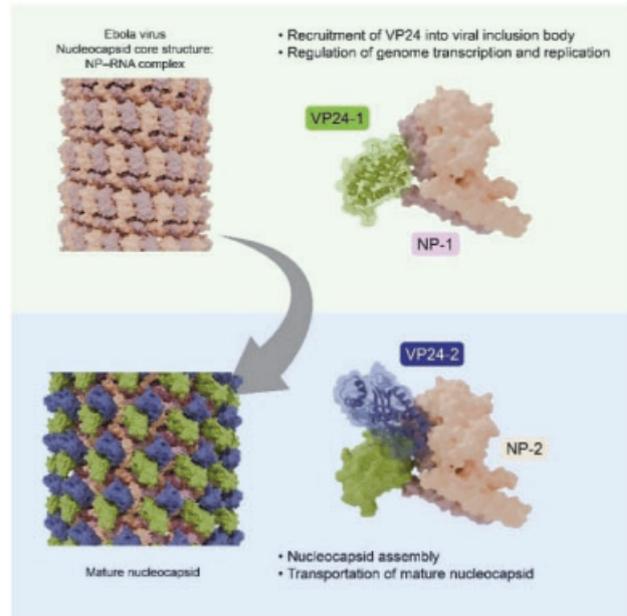


Fig. 2. Structure of the Ebola virus NP-RNA helical complex associated with VP24.

Our laboratory focuses on uncovering the replication mechanisms of highly pathogenic viruses, such as influenza virus and Ebola virus, combining various electron microscopies with traditional virological techniques to explore these processes from an ultrastructural perspective. Through a detailed understanding of viral replication at the molecular level, we aim to contribute to the development of antiviral drugs and antibody-based therapies to combat viral infections. In 2024, we investigated the intracellular replication

mechanisms of SARS-CoV-2, revealing the role of COPI in the intracellular transport of progeny viruses. We also determined the high resolution structure of the NP-VP24-RNA complex within the Ebola virus nucleocapsid, shedding light on the molecular basis of VP24's regulatory function.

1) Coatomer complex I is required for the transport of SARS-CoV-2 progeny virions from the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment.

SARS-CoV-2 undergoes budding within the lumen of the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC), and the progeny virions are delivered to the cell surface via vesicular transport. However, the molecular mechanisms remain poorly understood. Using three-dimensional electron microscopic analysis, such as array tomography and electron tomography, we found that virion-transporting vesicles possessed protein coats on their membrane and demonstrated that the protein coat was coatomer complex I (COPI) (Fig. 1). During the later stages of SARS-CoV-2 infection, we observed a notable alteration in the distribution of COPI and ERGIC throughout the cytoplasm, suggesting their potential involvement in virus replication. Depletion of COPI2, a key component of COPI, led to the confinement of SARS-CoV-2 progeny virions within the ERGIC at the perinuclear region. While the expression levels of viral proteins within cells were comparable, this depletion significantly reduced the efficiency of virion release, leading to the significant reduction of viral replication. Hence, our findings suggest COPI as a critical player in facilitating the transport of SARS-CoV-2 progeny virions from the ERGIC. Thus, COPI could be a promising target for the development of antivirals against SARS-CoV-2.

2) Structural basis for Ebola virus nucleocapsid assembly and function regulated by VP24.

The Ebola virus, a member of the Filoviridae family, causes severe hemorrhagic fever in humans. Filamentous virions contain a helical nucleocapsid responsible for genome transcription, replication, and packaging into progeny virions. The nucleocapsid consists of a helical nucleoprotein (NP) –viral genomic RNA complex forming the core structure, to which VP24 and VP35 bind externally. Two NPs, each paired with a VP24 molecule, constitute a repeating unit. However, the detailed nucleocapsid structure remains unclear. Here, we determine the nucleocapsid-like structure within virus-like particles at 4.6 Å resolution using single-particle cryo-electron microscopy (Fig. 2). Mutational analysis identifies specific interactions between the two NPs and two VP24s and demonstrates that each of the two VP24s in different orientations distinctively regulates nucleocapsid assembly, viral RNA synthesis, intracellular transport of the nucleocapsid, and infectious virion production. Our findings highlight the sophisticated mechanisms underlying the assembly and functional regulation of the nucleocapsid and provide insights into antiviral development.

List of Publication

Masui, A., Hashimoto, R., Matsumura, Y., Yamamoto, T., Nagao, M., Noda, T., Takayama, K., Gotoh, S.

- (2024) Micro-patterned culture of iPSC-derived alveolar and airway cells distinguishes SARS-CoV-2 variants. **Stem Cell Reports**. *19*, 545-561.
- Zhang, Z., Takenaga, T., Fehling, S.K., Igarashi, M., Hirokawa, T., Muramoto, Y., Yamauchi, K., Onishi, C., Nakano, M., Urata, S., Groseth, A., Strecker, T., Noda, T. (2024) Hexestrol, an estrogen receptor agonist, inhibits Lassa virus entry. **Journal of Virology**. *98*, e0071424.
- Sakai, M., Masuda, Y., Tarumoto, Y., Aihara, N., Tsunoda, Y., Iwata, M., Kamiya, Y., Komorizono, R., Noda, T., Yusa, K., Tomonaga, K., Makino, A. (2024) Genome-scale CRISPR-Cas9 screen identifies host factors as potential therapeutic targets for SARS-CoV-2 infection. **iScience**. *27*, 110475.
- Iida, T., Ando, J., Yoshimura, M., Makino, A., Nakano, M., Kogo, Y., Shinoda, H., Toyoda, M., Noda, T., Watanabe, R. (2024) Portable wide-field femtoliter-chamber imaging system for point-of-care digital bioanalysis. **iScience**. *27*, 110868.
- Im, D., Jormakka, M., Juge, N., Kishikawa, J.I., Kato, T., Sugita, Y., Noda, T., Uemura, T., Shiimura, Y., Miyaji, T., Asada, H., Iwata, S. (2024) Neurotransmitter recognition by human vesicular monoamine transporter 2. **Nature Communications**. *15*, 7661.
- Kuwata, T., Kaku, Y., Biswas, S., Matsumoto, K., Shimizu, M., Kawanami, Y., Uraki, R., Okazaki, K., Minami, R., Nagasaki, Y., Nagashima, M., Yoshida, I., Sadamasu, K., Yoshimura, K., Ito, M., Kiso, M., Yamayoshi, S., Imai, M., Ikeda, T., Sato, K., Toyoda, M., Ueno, T., Inoue, T., Tanaka, Y., Kimura, K.T., Hashiguchi, T., Sugita, Y., Noda, T., Morioka, H., Kawaoka, Y., Matsushita, S. (2024) Induction of IGHV3-53 public antibodies with broadly neutralising activity against SARS-CoV-2 including Omicron subvariants in a Delta breakthrough infection case. **EBioMedicine**. *110*, 105439.
- Hirabayashi, A., Muramoto, Y., Takenaga, T., Tsunoda, Y., Wakazaki, M., Sato, M., Fujita-Fujiharu, Y., Nomura, N., Yamauchi, K., Onishi, C., Nakano, M., Toyooka, K., Noda, T. (2024) Coatomer complex I is required for the transport of SARS-CoV-2 progeny virions from the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. **mBio**. e0333124.
- Fujita-Fujiharu, Y., Hu, S., Hirabayashi, A., Takamatsu, Y., Ng, Y.N., Hourii, K., Muramoto, Y., Nakano, M., Sugita, Y., Noda, T. (2025) Structural basis for Ebola virus nucleocapsid assembly and function regulated by VP24. **Nature Communications**. *16*, 2171.
- Sugiyama, A., Minami, M., Ugajin, K., Inaba-Inoue, S., Yabuno, N., Takekawa, Y., Xiaomei, S., Takei, S., Sasaki, M., Nomai, T., Jiang, X., Kita, S., Maenaka, K., Hirose, M., Yao, M., Gooley, P.R., Moseley, G.W., Sugita, Y., Ose, T. (2025) Structural analysis reveals how tetrameric tyrosine-phosphorylated STAT1 is targeted by the rabies virus P-protein. **Science Signaling**. *18*, eads2210.
- Iida, K., Ajiro, M., Nakano-Kobayashi, A., Muramoto, Y., Takenaga, T., Denawa, T., Kurosawa, R., Noda, T., Hagiwara, M. (2025) Switching of OAS1 splicing isoforms overcomes SNP-derived vulnerability to SARS-CoV-2 infection. **BMC biology**. *23*, 60.

List of Presentation

<海外での招待講演・一般演題>

Yukihiko Sugita, Yuya Hirai, Shinya Goto, Keizo Tomonaga, Takeshi Noda, Masayuki Horie. Structural insights into the Borna disease virus 1 nucleoprotein-RNA complex assembly via cryo-electron microscopy. The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity. Kyoto, September 10-12, 2024. (招待講演)

Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Exploring virus replication mechanisms with advanced technologies: cryo-EM and human respiratory organoids. 3rd France-Japan symposium on HIV/AIDS & Infectious disease basic research. Paris, France, October 28-30, 2024. (招待講演)

Yukihiko Sugita. Challenges in structural analysis of viral complexes and other biomolecules by cryo-EM. 2025 Cryo-Electron Microscopy Course. Okinawa, January 27-31, 2025. (招待講演)

Chiharu Nogami, Masahiro Nakano, Sho Miyamoto, Takeshi Noda. Visualizing Influenza A Virus vRNPs Assembly Dynamics by High-Speed Atomic Force Microscopy. The 21st International Joint Minisymposium on Molecular and Cell Biology. Kyoto, July 8, 2024.

Shinya Goto, Yuya Hirai, Takeshi Noda, Masayuki Horie, Yukihiko Sugita. Cryo-EM structure of the Borna disease virus 1 RNA-free nucleoprotein complex. IUPAB2024. Kyoto, July 25, 2024.

Shinya Goto, Yuya Hirai, Keizo Tomonaga, Takeshi Noda, Masayuki Horie, Yukihiko Sugita. Structure-based mutational analysis of Borna disease virus 1 nucleoprotein complexes provides insights into N-RNA complex assembly process. The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity. Kyoto, September 10-12, 2024.

Yukihiko Sugita. Structures of the mononegavirus nucleoprotein-RNA complex. The 30th East Asia Joint Symposium. Taiwan, October 29 – November 1, 2024.

Yukihiko Sugita, Yuya Hirai, Shinya Goto, Keizo Tomonaga, Takeshi Noda, Masayuki Horie. Cryo-EM structures of Borna disease virus 1 RNA-free and RNA-bound nucleoprotein complex. Molecular Determinants of Zoonotic Viruses and Beyond. Freiburg, Germany, February 27– March 1, 2025

<国内での招待講演・一般演題>

野田岳志「ウイルスの構造解析と構造情報を用いた抗ウイルス薬開発研究」、第37回インフルエンザ研究者交流の会、松山市、2024年7月4-6日 (招待講演)

野田岳志「ウイルスを視る：古くて新しい電子顕微鏡解析」、第18回ウイルス学キャンプ、熱海市、2024年7月16 – 17日 (招待講演)

野田岳志「エボラウイルスの構造解析と創薬開発研究」、第32回抗ウイルス療法学会、熊本市、2024年8月29-31日 (招待講演)

野田岳志「新型コロナウイルスの細胞内輸送における COPI の役割」、第97回日本生化学会大会、横

浜市、2024年11月6-8日（招待講演）

野田岳志「エボラウイルスの細胞内増殖機構」、大阪大学微生物病研究所 Advanced Seminar Series, 大阪大学微生物病研究所、吹田市、2025年1月14日（招待講演）

野田岳志「さまざまな電子顕微鏡法を駆使したウイルス増殖機構の研究」、第24回bio電顕セミナー、オンライン、2025年3月6日（招待講演）

尾崎拓馬、平林愛、村本裕紀子、中野雅博、杉田征彦、野田岳志「A型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構の解明」、第18回ウイルス学キャンプ、熱海市、2024年7月16-17日

野上千華、中野雅博、宮本翔、野田岳志「Visualizing influenza A virus vRNPs assembly dynamics by high-speed atomic force microscopy」、ウイルス学若手研究集会2024、名古屋市、2024年11月7日

石田大空、村本裕紀子、大西知帆、野田岳志「ヒト由来細胞における鳥インフルエンザウイルス増殖性の解析」、ウイルス学若手研究集会2024、名古屋市、2024年11月7日

Yen Ni Ng, Yoko Fujita-Fujiharu, Shangfan Hu, Kazuya Hour, Yukihiko Sugita, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda “Structural Analysis of Ebola Virus Nucleoprotein Mutant Reveals RNA as a Nucleocapsid Structural Component”, 第47回日本分子生物学会年会、福岡市、2024年11月27-29日

がんウイルス分野
Laboratory of Tumor Viruses

准教授 酒井 博幸 Assoc. Prof. Hiroyuki Sakai

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（HPV: Human Papillomavirus）である。また共同研究者として、当研究所の教員であった土方誠先生がヒト肝炎ウイルスの研究を行っている。

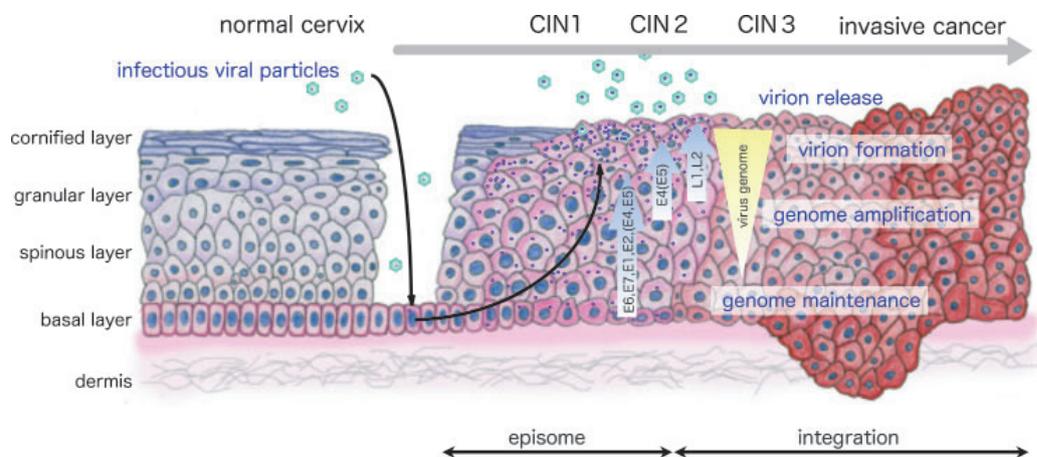
HPV は、ヒトの皮膚や粘膜にみられる重層上皮組織に感染する病原ウイルスである。このウイルスは厳格に分類されるわけではないが、皮膚指向性のものと粘膜指向性のものに分類される。また感染後の発がん性によってハイリスク型とローリスク型に分けることが出来る。ハイリスク型のものについては特に子宮頸癌発症との関連性は高く、その発症の主要因子と考えられている。

ヒト肝炎ウイルスの中で B 型肝炎ウイルス（HBV: Hepatitis B virus）、C 型肝炎ウイルス（HCV: Hepatitis C virus）、そして D 型肝炎ウイルス（HDV: Hepatitis D virus）は、それぞれ分類上はまったく異なるウイルスであるが、血液などの体液を介してヒトに感染することで慢性肝炎を引き起こし、肝硬変、肝がんへと病態を進行させることが知られている。

1) HPV 複製に関する研究

感染細胞における HPV の複製は上皮細胞の分化段階によって制御されている。このウイルスは未分化の上皮細胞に感染するが、そこではほぼ潜伏感染状態にある。しかし感染細胞の分化が進むとウイルスの遺伝子発現、およびウイルスゲノムの複製が活性化され重層上皮の最表層部の細胞内には大量の感染性ウイルス粒子が含まれることとなる。この「細胞分化依存的なウイルス複製様式」のメカニズムを調べることを研究目的としている。

今年度は、in vitro で構築した皮膚モデル培養系を用いた HPV の複製モデルを利用して、ウイルスのコードす



This figure is partially modified and quoted from *Nat Rev Cancer* 7: 11-22. (2007).

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活性が期待できる化合物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、また子宮頸部等に認められる異形性や、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。

3) HBV の慢性感染に対する新たな治療法の開発

HBV の外被タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製して、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた HBV 持続感染モデル系によって、抗体を用いた新たな慢性 B 型肝炎治療法の実験を進めた。

The main project is the comprehensive analysis of human papillomavirus (HPV). The infection of HPV is involved in tumorigenesis and malignant progression of stratified epithelium. The other project is the development of new strategies for liver cancer caused by hepatitis viruses, which is directed by Dr. Hijikata.

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.

3) Development of new monoclonal antibody against HBV surface antigen (HBsAg)

The monoclonal antibody against HBsAg was developed and shown to inhibit the HBV infection in vitro and in vivo.

List of Publications

Grace Naswa Makokha , Huarui Bao, C. Nelson Hayes, Maidina Abuduwaili, Elijah Songok, Makoto Hijikata, Kazuaki Chayama (2024). The prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus in Kenya: A systematic review and meta-analysis. **J. Epi. Glo. Heal.** doi.org/10.1007/s44197-024-00299-1.

Hiromi Abe-Chayama, Takakazu Kawase, Tatsuo Ichinohe, Yuji Ishida, Chise Tateno, Makoto Hijikata, Kazuaki Chayama (2024). Hepatitis B virus-specific human stem cell memory T cells differentiate into

cytotoxic T cells and eradicate HBV-infected hepatocytes in mice. **FEBS Lett.** doi.org/10.1002/1873-3468.14842.

List of Presentations

土方 誠 B型肝炎ウイルス感染制御法開発の取り組み 第8回鹿児島大学感染症制御のためのシンポジウム、鹿児島、2024年12月18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

助 教 森田 大輔 Assist. Prof. Daisuke Morita

研究室の原点である結核脂質免疫の発展型として、N ミリスチ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、リポペプチド提示分子を導入したトランスジェニックマウスの解析から、リポペプチド免疫応答は従来のペプチド特異的な T 細胞応答とは異なり、その機能にペプチド輸送体 TAP を必要としないことを明らかにした。

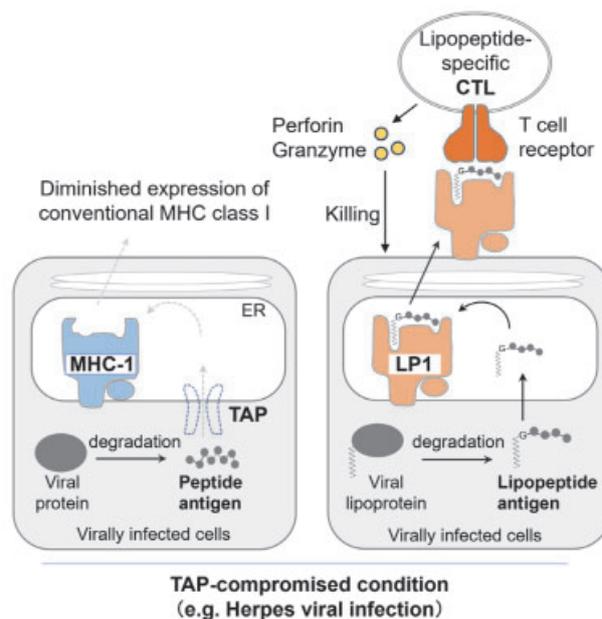
1) リポペプチド免疫研究に資する新たな動物モデルの確立

本研究分野では、アカゲザルエイズモデルの免疫解析 (J. Immunol. 2011, J. Virol. 2013) を起点として、ウイルスのリポタンパク質に由来するリポペプチドを認識する細胞傷害性 T 細胞の存在を明らかにし、リポペプチド認識の分子機構の解明を進めてきた。そして、N- ミリスチル化リポペプチドを結合し T 細胞に提示する新たなアカゲザル及びヒト MHC クラス 1 分子群 (Mamu-B*098, Mamu-B*05104, HLA-A*2402, HLA-C*1402) を同定し、一連の X 線結晶構造解析からリポペプチド抗原提示の分子機構を明らかにしてきた (Nat. Commun. 2016, J. Immunol. 2019, Int. Immunol. 2020, J. Biol. Chem. 2022)。本年度はリポペプチド免疫応答を個体レベルで解析するため、アカゲザル由来のリポペプチド提示 MHC クラス 1 である Mamu-B*098 をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスを作出した。この Tg マウスにおいて、Mamu-B*098 は検証した全ての細胞種において細胞表面において発現していた。また、Mamu-B*098 Tg マウス脾臓由来 CD8 陽性 T 細胞をリポペプチド抗原で刺激すると、リポペプチド特異的な T 細胞応答が容易に検出された。以上から、Mamu-B*098 Tg マウスはリポペプチド免疫応答を解析するための新しいモデル動物として有用であると考えられた。

2) リポペプチド免疫応答は TAP ペプチド輸送体を必要としない

Mamu-B*098 分子は従来の MHC クラス 1 とは異なり、小胞体膜に発現するペプチド輸送体 TAP を欠損した細胞株においても正常に細胞表面発現できることが分かっていた。そこで、Mamu-B*098 Tg マウスを TAP KO マウスと掛け合わせ、リポペプチド免疫応答の TAP 依存性を評価した。このモデルにおいて、Mamu-B*098 は確かに TAP 非依存的に細胞表面に発現し、末梢の CD8 陽性 T 細胞数が non-Tg/TAP KO マウスと比べて有意に回復していた。さらに、脾臓 CD8 陽性 T 細胞から誘導されるリポペプチド特異的 T 細胞の数が Mamu-B*098 Tg マウスと Mamu-B*098 Tg/TAP KO マウスの間で差がないことを見出した。そして、このリポペプチド特異的 T 細胞はパーフォリンやグラ

ンザイムなどのエフェクター分子を発現し、Mamu-B*098 発現細胞をリポペプチド抗原存在下に傷害する典型的なキラー T 細胞であった。以上より、リポペプチド免疫は TAP 非存在下でも機能し、特異的なキラー T 細胞応答を誘導できることが明らかとなった。TAP はウイルス感染やガンにおいてしばしば免疫逃避の標的となることが知られている。リポペプチド免疫応答はこうした病原体やガンに対抗する手段として特に有効であると考えられた (図)。



1) Establishment of a Novel Animal Model for Studying Lipopeptide Immunity

To analyze lipopeptide-specific immune responses in a mouse model, we have generated a novel transgenic (Tg) mouse line that expresses the rhesus macaque-derived lipopeptide-presenting MHC class I molecule Mamu-B*098. In these Tg mice, Mamu-B*098 was expressed on the surface of all cell types tested. Furthermore, antigenic stimulation of splenic CD8-positive T cells with lipopeptides and bone marrow-derived dendritic cells resulted in readily detectable, lipopeptide-specific T cell responses. These findings indicate that Mamu-B*098 Tg mice serve as a useful animal model for investigating immune responses against lipopeptides.

2) Lipopeptide Immune Responses Does Not Require TAP Transporters

Unlike conventional MHC class I molecules, Mamu-B*098 can be normally expressed on the cell surface even in cell lines lacking the peptide transporter TAP, which is localized on the endoplasmic reticulum membrane. Based on this observation, we crossed Mamu-B*098 transgenic (Tg) mice with TAP knockout (KO) mice to evaluate the TAP dependency of lipopeptide immune responses. In this model, Mamu-B*098 was indeed expressed on the cell surface independently of TAP, and the number of peripheral CD8-positive T cells was significantly restored compared to non-Tg/TAP KO mice. Furthermore, we found no difference in the number of lipopeptide-specific T cells expanded from splenic CD8-positive T cells between Mamu-B*098 Tg mice and Mamu-B*098 Tg/TAP KO mice. These lipopeptide-specific T cells expressed effector molecules including perforin and granzyme B, and functioned as cytotoxic T cells that specifically killed Mamu-B*098-expressing cells in the presence of lipopeptide antigens. Taken together, these findings demonstrate that lipopeptide immunity can function and induce lipopeptide-specific cytotoxic T cells in the absence of TAP. Since TAP is a common target for immune evasion by viruses and cancers, lipopeptide immunity is considered to be particularly effective as a means to combat such pathogens and tumors (Figure).

List of Publication

Suzuki, H., Kunimatsu, Y., Yoshioka, Y., Asa, M., Yamasaki, S., Sugita, M., and Morita, D. (2025). TAP-independent induction of N-myristoylated lipopeptide-specific CTLs in transgenic mice expressing the rhesus MHC class I allomorph, Mamu-B*098. **Journal of Immunology**. Online ahead of print.

List of Presentations

岡本 将志、森田 大輔、秋葉 宏樹、服部 明、有地 法人、掛谷 秀昭、大野 浩章、井貫 晋輔 CD1a 拘束性 T 細胞を制御する結核菌由来リポペプチド DDM-838 の構造活性相関研究第 41 回メディスナルケミストリーシンポジウム、京都、2024 年 11 月 20-22 日、

岡本 将志、森田 大輔、秋葉 宏樹、服部 明、有地 法人、掛谷 秀昭、大野 浩章、井貫 晋輔 脂質抗原提示タンパク質 CD1a に認識されるリポペプチド DDM-838 の構造活性相関研究日本薬学会第 145 年会、福岡、2025 年 3 月 28 日、

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

生体材料学分野
Laboratory of Biomaterials

助 教 安藤 満 Assist. Prof. Mitsuru Ando

本研究分野は、医療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、および技術に関して、材料科学の立場に立って研究開発を行っている。生体材料（バイオマテリアル）とは、体内で使用する、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、生体高分子、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。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

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ことを目的として、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、その関連遺伝子の徐放化技術の開発を行っている。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。

2) 幹細胞工学および再生・創薬研究のための生体材料

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。また、細胞移植再生治療のために利用可能な細胞を得るだけでなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の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。細胞を用いた薬の代謝、毒性を評価する創薬研究に加え、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。また、創薬研究において単層培養された細胞ではなく細胞集合体を用いた評価が注目を浴びているが、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とから、これらの問題を解決する技術、方法論を研究している。

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おり、これが薬物の副作用の主な原因となっている。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、および薬物の標的指向化など、様々に渡るがいずれにおいても薬物を修飾するための生体材料が必要であり、材料学の観点からの DDS 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 applicable to both basic and clinical medicines as well as to fundamental research in biology and medicine, from the perspective of material sciences. Materials designed for use within the body or for contact with biological substances such as proteins and cells are referred to as biomedical materials or biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials – based on polymers and their composites- are being designed and developed. These efforts aim not only at clinical applications but also at creating experimental tools essential for basic biomedical research, which provides scientific support for clinical medicine. More detailed explanation about every project is described.

1) Biomaterials for Regeneration Therapy

We are designing and fabricating 3-dimensional, porous biodegradable constructs to serve cell scaffolds of an artificial ECM, providing the local environment conducive to cells proliferation and differentiation. As additional strategy to promote cellular growth and differentiation, we are also developing biodegradable carriers made from gelatin and its derivatives for the controlled release of growth factors and genes. A new therapeutic approach that naturally induce tissue and organ regeneration through the controlled release of various biologically active growth factors has been established, and its therapeutic potentials have been scientifically demonstrated in animal models.

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

Technologies for cell culture using various biomaterials and bioreactors have been developed to efficiently isolate, expand, and differentiate stem cells, precursor cells, and progenitor cells. This research aims not only to prepare cells for regenerative medicine but also to advance materials and methods for basic biomedical research. These approaches are also applicable to drug discovery, particularly in assessing drug metabolism and toxicity. Carriers for low-molecular weight molecules, peptides, proteins, and nucleic acids are being studied to analyze stem cell functions and genetically modify cells to enhance their therapeutic potential. Cell culture using aggregates has gained attention in basic biology and drug discovery. However, in large sized aggregates, inner cells often die due to limited nutrients and oxygen. To address this, incorporating microspheres has been shown to improve cell function within aggregates.

3) Biomaterials for DDS

In generally, few drugs exhibit specific selectivity for their target sites. As a result, high doses are often required to achieve therapeutic efficacy in vivo, which frequently leads to adverse side effects. Drug Delivery Systems (DDS) are biomaterial-based technologies designed to deliver drugs to the right site of action, at the right time, and at the appropriate concentration. The objectives of DDS include controlled drug release, prolonged drug half-life, enhanced drug permeation and absorption, and targeted drug delivery. To achieve these goals, a wide range of biomaterials is essential.

List of Publications

Wenxuan, Y., S Abe., M Ando., and Y Tabata. (2024) Association with Cationized Gelatin Nanospheres Enhances Mitochondria Uptake and Membrane Potential. Tissue Engineering Part A 2024.12 PMID 39656101

List of Presentations

海外での一般演題

W Yang., S Abe., M Ando., and Y Tabata Feasibility of cationized gelatin nanospheres in mitochondria transplantation for activation of cell metabolism. 12th World Biomaterials Congress, Daegu, Korea, March 26-31, 2024

国内でのシンポジウム招待講演

鷺坂太一、田畑泰彦 モレキュラービーコンによるマクロファージ分化可視化のためのカチオン化ゼラチンキャリアのデザイン 日本核酸医薬学会第9回年会 若手シンポジウム、仙台、2024年7月15日

安藤 満 機能性材料としての膜タンパク質：集積技術と機能発現 2024KIPS 若手高分子シンポジウム、京都、2024年10月25日

鷺坂太一、雲財知、田畑泰彦 シルクエラスチン様タンパク質はマクロファージを抗炎症性に分極させる 日本薬学会第145回年会、福岡、2025年3月26日

国内での一般演題

W Yang., S Abe., M Ando., and Y Tabata Feasibility of cationized gelatin nanospheres in mitochondria transplantation. ミトコンドリアサイエンスワークショップ2024 (MSW2024)、和歌山、2024年7月2日

安藤 満、森山敬介、田畑泰彦 血小板膜被覆ゼラチンナノ粒子の作製 第40回日本 DDS 学会学術集会、筑波、2024年7月9-11日

M Ando., Y Sasaki., K Akiyoshi. Evaluation of biological function of tetraspanin CD9 on lipid bilayer vesicles and extracellular vesicles. 第40回日本 DDS 学会学術集会、筑波、2024年7月9日-11日

- 鷲坂太一、田畑泰彦 創傷治癒のためのカチオン化ゼラチン-mRNA 複合体の設計 第40回日本 DDS 学会学術集会、筑波、2024年7月9-11日
- Yu-Min Chen., S Horishita., Y Tabata Controlled release of TGF- β 1 from gelatin hydrogels for lung fibrosis model. 第40回日本 DDS 学会学術集会、筑波、2024年7月9日-11日
- 森山敬介、安藤満、田畑泰彦 間葉系幹細胞膜被覆ゼラチンナノ粒子の機能と体内動態評価 第40回日本 DDS 学会学術集会、筑波、2024年7月9日-11日
- 石井健登、安藤満、田畑泰彦 M2 マクロファージ由来エクソソーム 徐放のためのカチオン化ゼラチンハイドロゲルの作製 第40回日本 DDS 学会学術集会、筑波、2024年7月9日-11日
- 東承吾、鷲坂太一、田畑泰彦 マクロファージの分化可視化のための DDS 化モレキュラービーコンの調製 第40回日本 DDS 学会学術集会 筑波、2024年7月9日-11日
- W Yang., S Abe., M Ando., and Y Tabata Cationized gelatin nanospheres association modifies mitochondria transplantation. 第40回日本 DDS 学会学術集会、筑波、2024年7月9日-11日
- 木村優汰、南光太郎、田畑泰彦 フィブリン分解産物の作製とマクロファージへの作用評価 第70回高分子研究発表会（神戸）、神戸、2024年7月11-12日
- 萬田紘史、雲財知、田畑泰彦 シルクエラスチンからなる細胞移植用インジェクタブルゲルの調製 第70回高分子研究発表会（神戸）、神戸、2024年7月11-12日
- 鷲坂太一、田畑泰彦 創傷治癒のためのカチオン化ゼラチン-bFGF mRNA 複合体の作製 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第19回若手研究発表会、京都、2024年7月27日
- Yu-Min Chen., S Horishita., Y Tabata TGF- β 1 incorporation into gelatin hydrogels for lung fibrosis model. 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第19回若手研究発表会、京都、2024年7月27日
- 森山敬介、安藤満、田畑泰彦 間葉系幹細胞膜被覆によるゼラチンナノ粒子の体内動態制御 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第19回若手研究発表会、京都、2024年7月27日
- 森山敬介、安藤満、田畑泰彦 生体高分子ナノ粒子の間葉系幹細胞膜による機能化 Functionalization of Biopolymer Nanospheres with Mesenchymal Stem Cell Membranes. 2024KIPS 若手高分子シンポジウム、京都、2024年10月25日
- W Yang., S Abe., M Ando., and Y Tabata Design of mitochondria delivery system by cationized gelatin nanospheres. 2024KIPS 若手高分子シンポジウム、京都、2024年10月25日
- 鷲坂太一、田畑泰彦 創傷治癒のためのゼラチンベース bFGF mRNA 徐放化担体の設計 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024 仙台、2024年10月28-29日
- Yu-Min Chen., C Tokoda., Y Tabata Mesenchymal stem cells cultured in a PET/EVOH non-woven scaffold retain high differentiation capacity in vitro. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024

仙台、2024年10月28-29日

W Yang., S Abe., M Ando., and Y Tabata Delivery of isolated mitochondria associated with cationized gelatin nanospheres increased the mitochondria activity in the recipient cell. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024、仙台、2024年10月28-29日

萬田紘史、雲財知、田畑泰彦 シルクエラスチンからなる細胞移植用インジェクタブルゲルの調製 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2024、仙台、2024年10月28-29日

鷺坂太一、田畑泰彦 創傷治癒治療を目的としたカチオン化ゼラチン-bFGF mRNA 複合体キャリアのデザイン 遺伝子・デリバリー研究会 熊本カンファレンス 2024、熊本、2024年11月14-15日

森山敬介、安藤満、田畑泰彦 間葉系幹細胞膜被覆によるゼラチンナノ粒子の炎症組織標的指向化 第14回 DDS 再生医療研究会、京都、2024年12月21日

W Yang., S Abe., M Ando., and Y Tabata Feasibility of cationized gelatin nanospheres in mitochondria transplantation. 第14回 DDS 再生医療研究会、京都、2024年12月21日

木村優汰、南光太郎、田畑泰彦 フィブリン分解産物の作製とマクロファージへの作用評価 第24回日本再生医療学会総会、横浜、2025年3月20-22日

鷺坂太一、田畑泰彦 カチオン化ゼラチン-bFGF mRNA 複合体徐放化材料の開発 第24回日本再生医療学会総会、横浜、2025年3月20-22日

Yu-Min Chen., C Tokoda., Y Tabata PET/EVOH nonwoven fabrics for expanding mesenchymal stem cells with high differentiation capacity. 第24回日本再生医療学会総会、横浜、2025年3月20-22日

萬田紘史、雲財知、田畑泰彦 シルクエラスチンからなる脂肪由来間葉系幹細胞内包インジェクタブルゲルの調製 第24回日本再生医療学会総会、横浜、2025年3月20-22日

W Yang., S Abe., M Ando., and Y Tabata Delivery of cationized gelatin nanospheres-associated mitochondria rescues mitochondrial functions. 第24回日本再生医療学会総会、横浜、2025年3月20-22日

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

再生免疫学分野
Laboratory of Immunology

教授	河本 宏	Prof.	Hiroshi Kawamoto
准教授	宮崎 正輝	Assoc. Prof.	Masaki Miyazaki
助教	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んでいる。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) 他家再生T細胞を用いたウイルス感染症治療用細胞製剤の開発

2020年にパンデミックを起こしたCOVID-19は、ワクチンあるいは感染で免疫を獲得した事により収束に向かいつつあるが、現時点でも一定レベルの死者数が報告されている。これまでに複数種の抗ウイルス薬が開発されたが、その効果は限定的であり、有効な治療薬の開発が望まれている。我々はCOVID-19に対してES/iPS細胞から再生したキラーT細胞を用いた細胞製剤の開発を進めてきた。SARS-CoV2特異的TCRのクローニングは大阪大学の山崎晶研究室と藤田医科大学の河本研で進められ、山崎研ではHLA-A2402、A0201、B3501拘束性のTCRが取得され、藤田医大ではA2402、A0201拘束性のTCRが取得された。HLA欠失ES細胞から再生したキラーT細胞に、レトロウイルスを用いて各TCR遺伝子を導入し、Sタンパクを強制発現させたBリンパ芽球様細胞株を標的にして細胞傷害活性を測定したところ、全てのTCRについて細胞傷害活性を確認できた。そのうち一つのTCRについて、Sタンパクを強制発現させた肺胞上皮細胞株を用いた細胞傷害活性実験の一例を示す(図2)。

臨床試験に向けては、抗がん剤で免疫不全となった患者に起こる難治性COVID-19を対象にした開発研究を、藤田医科大学で進めている。日本ではA2402とA0201の保有率はそれぞれ約60%と20%なので、2種類のT細胞製剤で約70%をカバーできる事になる。試算によれば、TCRを10種類用意すれば90%以上の日本人をカバーできる。この戦略は他のウイルスにも使えるはずなので、SARS、MERS、鳥インフルなどの既知のウイルスに対してT細胞製剤のラインアップを作製して備蓄しておくことが可能と考えている。さらに、将来未知のウイルスによるアウトブレイクが起こった際にも、ウイルスの正体が判明した後に2-3ヶ月で治療用T細胞製剤のラインアップを作製することが、技術的には十分可能と考えている。

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. In 2023, we have succeeded in developing the technology by which NK cell-mediated immune reaction can be avoided.

2) Development of cell-based therapeutics for viral infections using allogeneic T cells

COVID-19, which caused a pandemic in 2020, is gradually subsiding due to immunity acquired through vaccination or infection, but a certain number of deaths are still being reported at this point. We have been advancing the development of a cell therapy using killer T cells regenerated from ES/iPS cells for COVID-19. The cloning of SARS-CoV-2-specific TCRs was conducted at the Sho Yamasaki Laboratory at Osaka University and the Kawamoto Laboratory at Fujita Health University. At the Yamasaki Laboratory, TCRs restricted to HLA-A2402, A0201, and B3501 were obtained, while at Fujita Health University, TCRs

restricted to A2402 and A0201 were obtained. Killer T cells regenerated from HLA-deficient ES cells were infected with retroviruses to introduce each TCR gene, and cytotoxic activity was measured using B lymphoblastoid cell lines expressing the S protein as target cells. Cytotoxic activity was confirmed for all TCRs. An example of a cytotoxicity experiment for one of the TCRs, using an alveolar epithelial cell line in which S protein was enforced to be expressed as target cells, is shown (Figure 2).

For clinical trials, development research targeting refractory COVID-19 taking place in immunocompromised patients caused by anticancer drugs is being conducted at Fujita Health University. In Japan, the prevalence rates of A2402 and A0201 are approximately 60% and 20%, respectively, so two types of T cell preparations can cover approximately 70% of the population. According to estimates, preparing 10 types of additional TCRs would cover more than 90% of the Japanese population. This strategy should also be applicable to other viruses, so we believe it is possible to prepare and stock a lineup of T cell medicines targeting known viruses such as SARS, MERS, and avian influenza. Furthermore, in the event of a future outbreak caused by an unknown virus, we believe it is technically possible to develop a lineup of therapeutic T cell therapies within 2-3 months after the virus is identified.

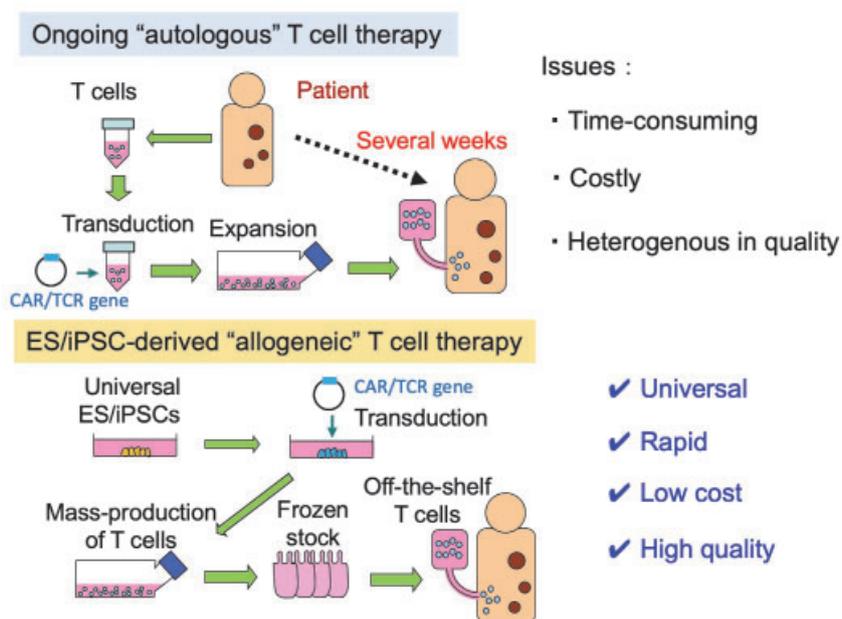


Figure 1 Development of off-the-shelf T cells to be used for the treatment of cancer

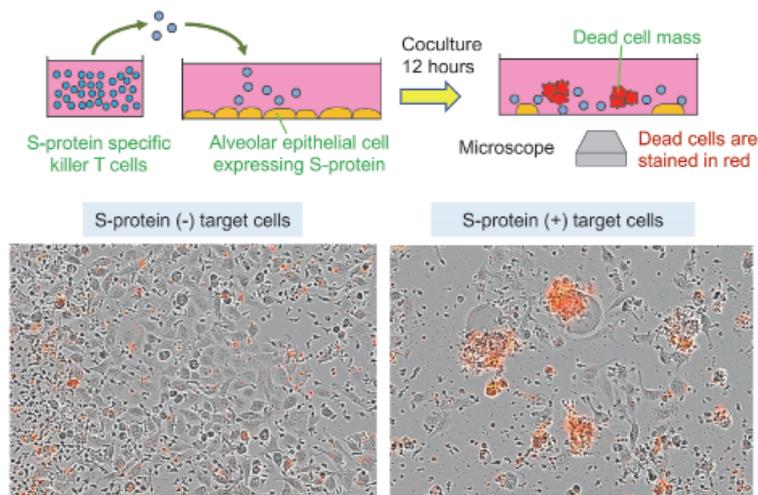


Figure 2 Killer T cells expressing TCR specific for S-protein of SARS-CoV-II efficiently killed alveolar epithelial cells expressing S-protein

List of Publications

Shimba A, Tani-Ichi S, Masuda K, Cui G, Munakata S, Abe S, Kitano S, Miyachi H, Kawamoto H, Ikuta K. (2024). A Chimeric IL-7R α /IL-2R β Receptor Promotes the Differentiation of T Cell Progenitors into B Cells and Type 2 Innate Lymphoid Cells. **J Immunol** 1;213 (7):952-964.

Miyazaki M, Miyazaki K. The function of E2A in B-cell development. (2024). **Adv. Exp. Med. Biol.** 1459:97-113.

Miyazaki K, Horie K, Hitomi Watanabe, Reiko Hidaka, Rinako Hayashi, Norihito Hayatsu, Kentaro Fujiwara, Rei Kuwata, Takuya Uehata, Yotaro Ochi, Makoto Takenaka, Risa Karakida Kawaguchi, Koichi Ikuta, Osamu Takeuchi, Seishi Ogawa, Katsuto Hozumi, Georg A Hollander, Gen Kondoh, Taishin Akiyama, Miyazaki M. (2025). A feedback amplifier circuit with Notch and E2A orchestrates T-cell fate and suppresses the innate lymphoid cell lineages during thymic ontogeny. **Genes and Development** 39 (5-6):384-400.

Shinya Abe, Moe Kagao, Takuma Asahi, Ryoma Kato, Shizue Tani-Ichi, Akihiro Shimba, Riki Ishibashi, Hitoshi Miyachi, Satsuki Kitano, Masaki Miyazaki, Hans-Reimer Rodewald, Fumiko Toyoshima, Koichi Ikuta. (2025). The transcription factor ROR α is required for the development of type 1 innate lymphoid cells in adult bone marrow. **J. Immunol** 214 (4):575-581.

河本宏、川瀬孝和、永野誠治 (2024). ES/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 - **臨床血液** 65 (9). 1075-1086.

河本宏、川瀬孝和、永野誠治 (2025). 組織再生を目指した研究開発 多能性幹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 - **病理と臨床** 43 (3). 0269-0276.

List of Presentation

Miyazaki M. The Amplifier Circuit of the E2A-Notch1 Axis Orchestrates T-cell Lineage Commitment and Suppresses Innate Lymphoid Cell Development During the Thymic Ontogeny. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Gene Expression & Signaling in Immune System. Cold Spring Harbor, NY, April 16- 21st, 2024.

Kawamoto, H. Regeneration of cytotoxic T lymphocytes from pluripotent cells: Application to viral infections. ThymE24: T cell and Thymus Biology. Port, Portugal, May 27-31, 2024.

Kawamoto, H. Regeneration of cytotoxic T lymphocytes from pluripotent cells: Development of “off-the-shelf T cell medicine” for cell therapy targeting cancer and viral infection. The 9th Annual Meeting of Society for Stem Cell Research. Bangkok, Thailand, March 3, 2025.

河本宏 免疫を知り、免疫を創る：免疫の仕組み入門と細胞医薬の現状 第42回日本骨代謝学会学術集会、沖縄、2024年6月29日－7月2日

河本宏 T細胞を知る、創る：血液細胞の進化的起源の探索と再生T細胞を用いたがんおよびウイルス感染症の治療法の開発 第34回日本サイトメトリー学会学術集会、オンライン開催（oViceプラットフォームバーチャル会場及びZOOM配信）、2024年7月6日－7日

河本宏 ES/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32回日本組織適合性学会大会、愛知、2024年9月26日－28日

河本宏 ES/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86回日本血液学会学術集会、京都、2024年10月11日－13日

河本宏 ES/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1回 International Conference on Immunity and Cognition: integration of multidisciplinary approaches of Neuroscience, Endocrinology, Metabolic and Osteoimmunology (IC2NEMO)、長野、2025年1月28日－31日

河本宏 多能性幹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 - 令和6年度大阪大学先導的学際研究機構創薬サイエンス部門シンポジウム、大阪、2025年2月4日

西村有史、河本宏 制御性T細胞は自己免疫疾患発症後の治療効果を有しうる 第33回 Kyoto T Cell Conference、京都、2024年6月14日－15日

板原多勇、増田喬子、荒瀬尚、寺田晃司、縣保年、加藤雄真、河本宏 超汎用性細胞の開発：HLA-KO細胞に対するNK細胞からの攻撃の回避 第24回日本再生医療学会総会、横浜、2025年3月20日－22日

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

臓器連関研究チーム
Inter-Organ Communication Research Team

特定准教授 河岡 慎平 Program-Specific Assoc. Prof. Shinpei Kawaoka

本分野では、がんに関連する宿主の病態生理メカニズムに関する研究や、アバターやロボット、デバイスといった先端技術の活用が人の生体機能に及ぼす影響に関する研究を実施している。今年度は、マウスモデルを基盤とした基礎的研究を、乳がん患者を対象とした臨床応用研究へと大きく展開させた。

1) 乳がん患者を対象とした時系列サイトカイン解析

血液中のサイトカインは、がん治療の奏効性を予測する可能性があることが知られているが、個体差や一時点の測定値だけでは有効なバイオマーカーの同定は困難である。そこで本研究では、トリプルネガティブ乳がん患者から治療前（診断時）から治療中、治療後にわたる複数回の血液採取を行い、時系列でのサイトカイン動態を解析した。治療前から手術後1年までの計5時点で69種のサイトカインを測定し、ネットワーク解析を含む多角的解析を実施した。その結果、IL-1やTRAILなど複数のサイトカインの初期発現量と化学療法効果に有意な関連性が見出され、治療前の分子プロファイルによって治療反応を一定の精度で予測できる可能性が示唆された。個体内での経時変化を把握するアプローチの有効性を、患者コホートで実証できた意義は大きい。

2) 乳がんの転移リンパ節に対する空間オミクス解析

乳がんのリンパ節転移は臨床上重要な課題であり、本来免疫細胞に富んだリンパ節において、がん細胞がどのように免疫監視を回避するかは未解明な点が多い。本研究では、同一患者由来の転移リンパ節と非転移リンパ節を比較することで、転移巣局所に特異的に生じる免疫環境の変化を解析した。その結果、CD169陽性マクロファージという、抗原提示能を有するリンパ組織特異的マクロファージが転移リンパ節で著しく減少していることを突き止めた。他の主要な免疫細胞群には顕著な変化が見られず、CD169陽性マクロファージが選択的に標的化される可能性が示唆された。以上の結果をがんの免疫療法効果を制御する新たなメカニズムとして報告した。また、Vandenbon先生との共同研究で、空間オミクスデータベース DeepSpaceDB の活用に関する研究も進めた。

3) ムーンショット型研究の推進

ムーンショット型の「アバター共生社会」プロジェクトを推進し、対話や遠隔操作デバイスの使用が人の生体応答に及ぼす影響について、マルチオミクス解析を軸とした先駆的データを蓄積しつつある。

The Inter-Organ Communication Research Team investigates the mechanisms underlying host pathophysiology in cancer and explores how the application of advanced technologies—such as avatars, robots, and devices—affects human physiological functions. This fiscal year, we significantly expanded our foundational research based on mouse models into translational studies involving breast cancer patients.

1) Time-series cytokine profiling in breast cancer patients

Cytokines circulating in the blood have the potential to serve as predictors of cancer treatment response. However, due to individual variability and the limitations of single time-point measurements, identifying reliable biomarkers remains challenging. In this study, we conducted repeated blood sampling from triple-negative breast cancer patients at multiple stages before and after treatment to analyze temporal changes in cytokine dynamics. A total of 69 cytokines were measured at five time points, from pre-treatment to one-year post-surgery. Comprehensive analyses, including network-based approaches, revealed significant correlations between baseline levels of cytokines such as IL-1 and TRAIL and the efficacy of chemotherapy. These findings suggest that pre-treatment molecular profiles could help predict treatment outcomes with a certain degree of accuracy. This study demonstrated the value of capturing intra-patient temporal changes through time-series analysis in a clinical cohort.

2) Spatial omics analysis of metastatic lymph nodes in breast cancer

Lymph node metastasis in breast cancer represents a critical clinical issue, yet the mechanisms by which cancer cells evade immune surveillance within lymph nodes, which are naturally rich in immune cells, remain incompletely understood. In this study, we compared metastatic and non-metastatic lymph nodes derived from the same patients to characterize local immune microenvironment changes specifically associated with metastasis. The analysis revealed a marked reduction of CD169-positive macrophages—lymph node-resident macrophages with antigen-presenting capabilities—in metastatic lymph nodes. Notably, other major immune cell populations showed no significant changes, suggesting that CD169-positive macrophages may be selectively targeted. We reported this as a novel mechanism that could influence the effectiveness of cancer immunotherapy. In addition, we are actively collaborating with Dr. Vandebon to promote the usage of spatial transcriptomics database DeepSpaceDB.

3) Advancement of Moonshot research projects

We are actively advancing the Moonshot project “Avatar Symbiotic Society”, aiming to elucidate how everyday interactions and the use of remote-control devices affect human physiological responses. Through multi-omics analyses, we are steadily accumulating pioneering data to shed light on these impacts.

List of Publications

Honcharuk, V., Zainab, A., Horimoto, Y., Takemoto, K., Diez, D., Kawaoka, S., and Vandebon, A. (2025).

DeepSpaceDB: a spatial transcriptomics atlas for interactive in-depth analysis of tissues and tissue microenvironments. bioRxiv.

Maeshima, Y., Kataoka, R.T., Vandenbon, A., Hirata, M., Takeuchi, Y., Suzuki, Y., Fukui, Y., Kawashima, M., Takada, M., Ibi, Y., Haga, H., Morita, S., Toi, M., Kawaoka, S., and Kawaguchi, K. (2024). Intra-patient spatial comparison of non-metastatic and metastatic lymph nodes reveals the reduction of CD169+ macrophages by metastatic breast cancers. *eBioMedicine* 107, 105271.

Oguchi, A., Suzuki, A., Komatsu, S., Yoshitomi, H., Bhagat, S., Son, R., Bonnal, R.J.P., Kojima, S., Koido, M., Takeuchi, K., Myouzen, K., Inoue, G., Hirai, T., Sano, H., Takegami, Y., Konishi, R., Sekito, S., Inoue, T., Kere, J., Takeda, S., Takaori-Kondo, A., Endo, I., Kawaoka, S., Kawaji, H., Ishigaki, K., Ueno, H., Hayashizaki, Y., Pagani, M., Carninci, P., Yanagita, M., ITEC consortium, Parrish, N., Terao, C., Yamamoto, K., and Murakawa, Y. (2024). An atlas of transcribed enhancers across helper T cell diversity for decoding human diseases. *Science* 385, eadd8394.

Nakamura, Y., Saldajeno, D.P., Kawaguchi, K., and Kawaoka, S. (2024). Progressive, multi-organ, and multi-layered nature of cancer cachexia. *Cancer Sci.* 115, 715–722.

Saldajeno, D.P., Kawaoka, S., Masuda, N., Tanaka, S., Bando, H., Nishimura, T., Kadoya, T., Yamanaka, T., Imoto, S., Velaga, R.V., Tamura, N., Aruga, T., Ikeda, K., Maeshima, Y., Takada, M., Suzuki, E., Ueno, T., Ogawa, S., Haga, H., Ohno, S., Morita, S., Kawaguchi, K., and Toi, M. (2024). Time-series blood cytokine profiles correlate with treatment responses in triple-negative breast cancer patients. *Br. J. Cancer* 130, 1023–1035.

List of Presentations

Shinpei Kawaoka. がん起因する全身性の代謝・免疫の変容 第11回日本サルコペニア・悪液質・消耗性疾患研究会、横浜、2024年4月6日

Shinpei Kawaoka. HFSP への応募を振り返る HFSP guidance in Tohoku、仙台、2024年4月25日

Maeshima, Y., Kataoka, R.T., Vandenbon, A., Hirata, M., Takeuchi, Y., Suzuki, Y., Fukui, Y., Kawashima, M., Takada, M., Ibi, Y., Haga, H., Morita, S., Toi, M., Shinpei Kawaoka, and Kawaguchi, K. Selective elimination of CD169+ macrophages in lymph node invaded by breast cancers. AACR, 2024年5月2日

Shinpei Kawaoka. Systemic metabolic and immune defects in advanced cancer patients prior to the onset of pre-cachexia. Keystone Symposia for Cachexia and Wasting Syndrome in Cancer and Chronic Diseases, 2024年5月6–7日

Shinpei Kawaoka. がんカヘキシアにおける全身性の免疫・代謝変化 第66回日本老年医学会、2024年6月15日

Shinpei Kawaoka. がん起因する宿主の病態生理に関する研究 第30回 The Medical Frontier Conference、2024年6月29–30日

- 中村有輝、依田真由子、小原乃也、和泉自泰、高橋政友、中谷航太、馬場健史、増田慎三、河口浩介、廣田圭司、河岡慎平. Roles of uridine phosphorylase 1 in cancer-dependent systemic metabolic alterations 京都大学医生物学研究所ランチタイムセミナー、2024年7月5日
- 河岡慎平. がん起因する宿主の病態生理に関する研究 第32回日本乳癌学会、2024年7月11-13日
- 前島佑里奈、片岡竜貴、Alexis Vandebon、平田勝啓、竹内康英、鈴木穰、福井由紀子、川島雅央、高田正泰、揖斐裕実子、羽賀博典、森田智視、戸井雅和、河岡慎平、河口浩介. Selective elimination of CD169+ macrophages in lymph node invaded by breast cancers 第32回日本乳癌学会、2024年7月11-13日
- 河岡慎平. がん起因する全身の免疫・代謝変化を俯瞰する 第45回日本炎症・再生医学会、2024年7月17-18日
- 河岡慎平. がん起因する宿主の病態生理に関する統合的研究 愛知県がんセンター招聘セミナー、2024年8月5日
- Saldajeno, D.P., Shinpei Kawaoka. Time series analysis of medical data. 医生物学研究所リトリート2024、2024年9月2日
- Konishi, R., Hatano, A., Shinpei Kawaoka. Functional analysis of genomic enhancers that regulate the expression of mitochondrial chaperone in HepG2. 2024年度京都大学医生物学研究所リトリート、2024年9月2-3日
- 中村有輝、依田真由子、和泉自泰、鹿島幸恵、高橋政友、中谷航太、馬場健史、小西理予、Don Pietro Saldajeno、Alexis Vandebon、鈴木穰、戸井雅和、河口浩介、河岡慎平. Low albumin-correlated systemic immunosuppression in metastatic breast cancer patients 2024年度京都大学医生物学研究所リトリート、2024年9月2-3日
- Honcharuk, V., Zainab, A., Horimoto, Y., Takemoto, K., Dies, D., Shinpei Kawaoka, and Vandebon, A. DeepSpaceDB: a spatial transcriptomics atlas that allows interactive in-depth analysis of tissues and tissue microenvironments. NGS EXPO 2024, 2024年9月4日
- Zhao, H., Shinpei Kawaoka, Vandebon, A. Dissecting heterogeneity in liver pathophysiology using spatial transcriptomics. NGS EXPO 2024, 2024年9月4日
- Saldajeno, D.P., Shinpei Kawaoka. Time series analysis of medical data. 京都大学大学院医学研究科・医学部 第4回研究交流サロン、2024年9月27日
- Honcharuk, V., Zainab, A., Horimoto, Y., Takemoto, K., Dies, D., Shinpei Kawaoka, and Vandebon, A. DeepSpaceDB: an interactive database for spatial transcriptomics data. トーゴの日シンポジウム2024、2024年10月5日
- 河岡慎平. がん起因する宿主の代謝恒常性の破綻 2024年山口糖尿病フォーラム、2024年10月28日

- Honcharuk, V., Zainab, A., Horimoto, Y., Takemoto, K., Dies, D., Shinpei Kawaoka, and Vandebon, A. DeepSpaceDB: a spatial transcriptomics atlas for interactive in-depth analysis of tissues and tissue microenvironments. Asia & Pacific Bioinformatics Joint Conference 2024, 2024 年 10 月 23 日
- Honcharuk, V., Zainab, A., Horimoto, Y., Takemoto, K., Dies, D., Shinpei Kawaoka, and Vandebon, A. DeepSpaceDB: an Interactive Database for Spatial Transcriptomics Data. 30th East Asia Joint Symposium, 2024 年 10 月 29 日
- Shinpei Kawaoka. Understanding complex biological phenomena using large-scale data analysis. International Symposium on Physics of Intelligence — Statistical Mechanics and Machine Learning: A Powerful Combination of Data Analysis, 2024 年 11 月 6–8 日
- 中村有輝、依田真由子、小原乃也、和泉自泰、高橋政友、中谷航太、馬場健史、増田慎三、河口浩介、廣田圭司、河岡慎平. がんによる全身性代謝変容における uridine phosphorylase 1 の役割 第 97 回日本生化学会大会、2024 年 11 月 6–8 日
- 河岡慎平. がん悪液質でみられる全身性の代謝変容と NAD 代謝 第 97 回日本生化学会大会、2024 年 11 月 6–8 日
- 前田（小西）理予, 河岡 慎平. HepG2 細胞においてミトコンドリアシャペロンの発現を制御するゲノミックエンハンサーの機能解析 第 97 回日本生化学会大会、2024 年 11 月 7 日
- Vandebon, A., Zainab, A., Honcharuk, V., Takemoto, K., Dies, D., Shinpei Kawaoka, and Vandebon, A. DeepSpaceDB: an interactive spatial transcriptomics database that allows in-depth analysis of tissues and their substructures. 第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 28 日
- Shinpei Kawaoka. 多様な人材が開く学術の未来に関するシンポジウム：研究とコアファシリティのマネジメント人材の役割、2025 年 1 月 23 日
- Shinpei Kawaoka. Multi-modal data analyses to understand cancer cachexia, enhancer-dependent gene regulation, and physiological responses to daily activities. International Symposium on Cancer, Aging Biology and Bioinformatics — Toward Omics-driven prevention and medicine for aging and cancer — RIMD, Osaka University, 2025 年 2 月 18 日
- 河岡慎平. The New Era of Cancer Cachexia Research 学際ハブ展開領域が拓く新しいがん悪液質研究、2025 年 2 月 28 日

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

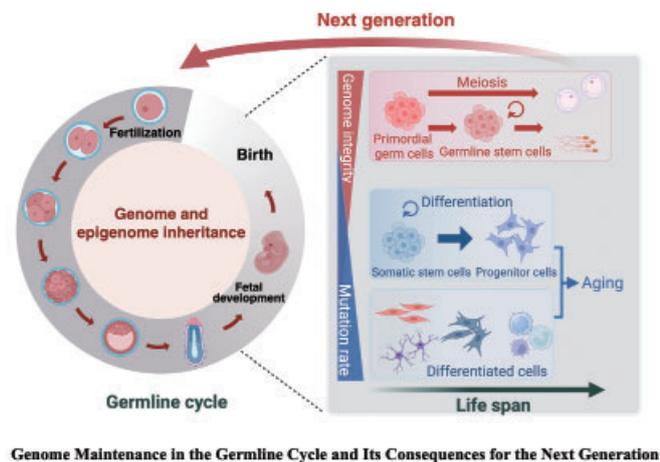
発生エピゲノム研究分野
Laboratory of Developmental Epigenome

准教授 中馬新一郎 Associate 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。

当研究グループ室では 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。



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

List of Publication

Hitomi Watanabe, Daiya Ohara, Shinichiro Chuma, Yusuke Takeuchi, Tomoatsu Takano, Ami Katanaya, Satohiro Nakao, Akihisa Kaneko, Takatoku Oida, Tatsuya Katsuno, Takuya Uehata, Toru Takeo, Munehiro Okamoto, Keiji Hirota, Gen Kondoh. Ca²⁺-evoked sperm cessation determines embryo number in mammals. Biorxiv. 2024

List of Presentation

Comparative Analysis of Mutational Responses to Genotoxic Stress in Germ and Somatic Cells in Mice. Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Tomoatsu Takano, Jinghang Li, Eri Hayashi, Shinichiro Chuma. 学術変革領域 (A) 「動的な生殖ライフスパン」 Next Generation Scientist meeting. Biwako-Lake Shiga. 2024.11.3 – 11.5

Methodological Overview of Genome Mutation Analysis in Germ Cell Research. Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Tomoatsu Takano, Jinghang Li, Eri Hayashi, Shinichiro Chuma. 医生物学研究所リトリート びわ湖大津プリンスホテル 2024.9.2-9.3

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。マウス精子の受精能に重要な役割を担う分子群の精子表面発現を指標にすると精子群が機能的に二分するが、本年度は、一方の精子群を除去すると受精率が向上することを見出した。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。本年度は、17型免疫応答が関わる自己免疫性関節炎モデルを用いて関節炎惹起性 T 細胞の不均一性と制御機構について解析をおこなった。

1) 精子表面に発現する GPI アンカー型タンパク質を指標にした精子機能の解明

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の GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) の挙動に注目して研究をすすめている。前年度までに、網羅的プロテオミクス法を用いてを同定した Lypd4 や網羅的抗体スクリーニング法を用いて同定した CD55 の精子表面発現を指標にすると、精子集団が機能的に二分されることを見出し、さらにこれらに対する抗体を用いて一方の精子群を除去すると、受精率が向上することを見出した。

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、IL-17 産生 Th17 細胞と Foxp3+ 制御性 T 細胞を可視化するためのレポーター系統を樹立し、自己免疫性関節炎における役割について評価した。一部の制御性 T 細胞が関節炎を起こす Th17 細胞にリプログラミングされうるかどうかを養子移入実験および単細胞 mRNA シークエンス解析をおこなった。また、関節局所の Th17 細胞の不均一性に関しても単細胞 mRNA シークエンス解析により特徴づけた。結果として、関節炎を維持する T 細胞サブセットは Th17 細胞であり、制御性 T 細胞は炎症増悪化に直接的には関わっていなかった。また、Th17 細胞は炎症関節内で異なる遺伝

子プロファイルを有するサブポピュレーションにクラスタリングできた。

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.

Although sperm groups are functionally dichotomized when indexed by sperm surface expression of a group of molecules that play an important role in the fertilization potential of mouse sperm, this year we found that removal of one sperm group improved the fertilization rate.

Moreover, through the utilization of mouse models for autoimmune arthritis, we study the heterogeneity and regulation of arthritogenic Th17 cells in inflamed joints.

1) Elucidation of sperm function using GPI-anchored proteins important for mouse sperm fertilization potential as indicators

It is known that mouse sperm acquire fertilization potential through a stepwise maturation process. In our previous study, we focused on the behavior of GPI-anchored proteins (GPI-APs) on the membrane surface of sperm during the fertilization ability acquisition process. In the previous year, we found that sperm surface expression of Lypd4, identified using a comprehensive proteomics method, and CD55, identified using a comprehensive antibody screening method, was used as an indicator to find that sperm populations were functionally divided into two groups. Furthermore, we found that removing one group of sperm using antibodies against these groups improved fertilization rates.

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 generated a reporter strain to visualize IL-17-producing Th17 cells and Foxp3⁺ regulatory T cells and evaluated their role in autoimmune arthritis. Adoptive transfer experiments and single-cell mRNA sequencing analysis were performed to determine whether some regulatory T cells can be reprogrammed into arthritogenic Th17 cells. We also characterized the heterogeneity of Th17 cells in inflamed joints by single-cell mRNA sequencing analysis. The results showed that the T-cell subset that maintained arthritis was Th17 cells, and regulatory T cells were not directly involved in the exacerbation of inflammation. In addition, Th17 cells within inflamed joints could be clustered into subpopulations with different gene expression profiles.

List of Publications

Ohara D, Takeuchi Y, **Hirota K**. Type 17 immunity: novel insights into intestinal homeostasis and autoimmune pathogenesis driven by gut-primed T cells. *Cell Mol Immunol*. 21:1183-1200. (2024)

- Yambe S, Yoshimoto Y, Ikeda K, Maki K, Takimoto A, Tokuyama A, Higuchi S, Yu X, Uchibe K, Miura S, **Watanabe H**, Sakuma T, Yamamoto T, Tanimoto K, **Kondoh G**, Kasahara M, Mizoguchi T, Docheva D, Adachi T, Shukunami C. Sclerostin modulates mineralization degree and stiffness profile in the fibrocartilaginous enthesis for mechanical tissue integrity. *Front Cell Dev Biol.* 2024 Jun 4;12:1360041. doi: 10.3389/fcell.2024.1360041. eCollection 2024.PMID: 38895158
- Nakai R, Yokota T, Tokunaga M, Takaishi M, Yokomizo T, Sudo T, Shi H, Yasumizu Y, Okuzaki D, Kokubu C, Tanaka S, Takaoka K, Yamanishi A, Yoshida J, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Horie K, Hosen N, Sano S, Takeda J. A newly identified gene *Ahed* plays essential roles in murine haematopoiesis. *Nat Commun.* 2024 Jun 25;15 (1):5090. doi: 10.1038/s41467-024-49252-7.
- Tani-Ichi S, Obwegs D, Yoshikawa A, **Watanabe H**, Kitano S, Ejima A, Hatano S, Miyachi H, Cui G, Shimba A, Abe S, Hori S, **Kondoh G**, Sagar, Yoshikai Y, Ikuta K. A RORE-dependent Intronic Enhancer in the IL-7 Receptor- α Locus Controls Glucose Metabolism via V γ 4+ γ δ T17 Cells. *J Immunol.* 2024 Aug 1;213 (3):283-295. doi: 10.4049/jimmunol.2300450.
- Watanabe H**, Ohara D, Chuma S, Takeuchi Y, Takano T, Katanaya A, Nakao S, Kaneko A, Oida T, Katsuno T, Uehata T, Takeo T, Okamoto M, **Hirota K**, **Kondoh G**. Ca²⁺-evoked sperm cessation determines embryo number in mammals. *bioRxiv* 2024.09.16.613169; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.09.16.613169>)
- Yimiti D, Uchibe K, Toriyama M, Hayashi Y, Ikuta Y, Nakasa T, Akiyama H, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Takimoto A, Shukunami C, Adachi N, Miyaki S. CD1530, selective RAR γ agonist, facilitates Achilles tendon healing by modulating the healing environment including less chondrification in a mouse model. *J Orthop Res.* 2025 Feb;43 (2):273-284. doi: 10.1002/jor.26006. Epub 2024 Nov 8.
- Miyazaki K, Horie K, **Watanabe H**, Hidaka R, Hayashi R, Hayatsu N, Fujiwara K, Kuwata R, Uehata T, Ochi Y, Takenaka M, Kawaguchi RK, Ikuta K, Takeuchi O, Ogawa S, Hozumi K, Holländer GA, **Kondoh G**, Akiyama T, Miyazaki M. A feedback amplifier circuit with Notch and E2A orchestrates T-cell fate and suppresses the innate lymphoid cell lineages during thymic ontogeny. *Genes Dev.* 2025 Mar 3;39 (5-6):384-400. doi: 10.1101/gad.352111.124.
- Yu X, Kawakami R, Yambe S, Yoshimoto Y, Sasaki T, Higuchi S, **Watanabe H**, Akiyama H, Miura S, Hu K, **Kondoh G**, Sagasaki R, Inui M, Adachi T, Docheva D, Imamura T, Shukunami C. Dynamic interactions between cartilaginous and tendinous/ligamentous primordia during musculoskeletal integration. *Development.* 2025 Mar 15;152 (6):dev204512. doi: 10.1242/dev.204512. Epub 2025 Mar 26.

List of Presentations

Luca D, Lee S, **Hirota K**, Okabe Y, Uehori J, Izawa K, Lanz L, Schütte V, Sivri B, Tsukamoto Y, Hauck F,

Behrend R, Roers A, Fujita T, Nishikomori R, Lee-Kirsch M, Kato H. Dysregulation of Treg homeostasis by ADAR1 deficiency and chronic MDA5 signaling. The 7th TOLL Conference, Rotterdam, Netherlands, 2024 年 04 月 18 日

Hirota K. Multi-organ Inflammation Driven by Autoimmune Single TCR-bearing T Cells. Immunology symposium at The Francis Crick Institute, London, UK, 2024 年 10 月 11 日

Ohara D, Takeuchi Y, **Watanabe H**, Lee Y, Mukoyama H, Ohteki T, **Kondoh G**, **Hirota H**. Novel IL-23 reporter mice reveals the cellular and molecular regulation of IL-23 production in mucosal host defense. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日

Takeuchi T Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. A three-stage differentiation pathway for highly arthritogenic CD103- CD200+ Th17 cells. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日

Mukoyama H, Takeuchi Y, Ohara D, Lee Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Differentiation and activation of monocytes/macrophages induced by GM-CSF signaling exacerbates synovial inflammation in autoimmune arthritis. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日

Lee Y, Ohara D, Mukoyama H, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**. Keratinocytes rather than antigen presenting cells are critical source of IL-23 in psoriasiform dermatitis. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日

Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Expression of CD103 and CD200 define functionally distinct arthritogenic Th17 cells. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日

Mukoyama H, Takeuchi Y, Ohara D, Lee Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. GM-CSF-dependent Macrophage Subpopulation Derived from Ly6Chi Monocytes Causes Development and Enhancement of Joint Inflammation in Autoimmune Arthritis. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日

Yasuda K, Aoki J, Tanaka K, Ohara D, **Hirota K**, Takeuchi O. Regnase-4 protects mice against HSV-1 infection by reinforcing type I interferon production. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日

Ohara D, Takeuchi Y, Lee Y, Mukoyama H, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**. Neutrophil-derived IL-23 p19 monomer suppresses type 17 immunity. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日

Lee Y, Ohara D, Mukoyama H, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**. IL-23 secretion by keratinocytes rather than antigen presenting cells play critical role in the pathogenesis of psoriasiform

dermatitis. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024年
12月04日

Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Heterogeneity and molecular basis
of arthritogenic Th17 cells in inflamed joints. Keystone Symposia: T Cell Differentiation in Tissue
Microenvironments, Vancouver, Canada, 2025年02月05日

病因免疫学分野
Laboratory of Immunopathogenesis

教授 伊藤 能永 Prof. Yoshinaga Ito
助教 大崎 一直 Assistant Prof. Motonao Osaki

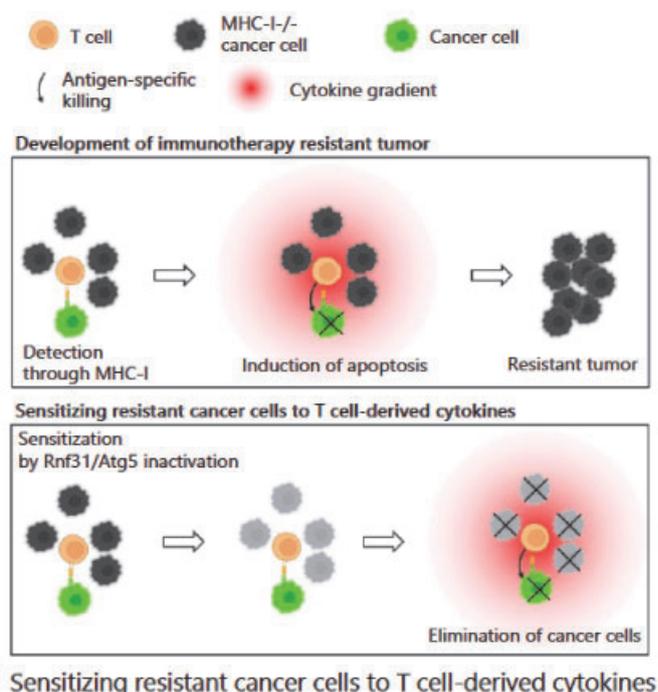
本分野では、自己組織に対する免疫応答機構の生理的な役割と、その破綻に起因する疾患の発症機構を明らかにすることをめざした研究を推進している。2024年においては、T細胞からのサイトカインに対する感受性を高めることが難治性がんに対する新規治療戦略となりうることを明らかにした。

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 (IFN γ や TNF α) 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 (IFN γ と TNF α) 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 IFN γ あるいは TNF α 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 IFN γ や TNF α 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、IFN γ +TNF α 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 IFN γ - and TNF α -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

Bandola-Simon, J., Ito, Y., Wucherpfennig, K.W., and Roche, P.A. (2025). Defective removal of invariant chain peptides from MHC class II suppresses tumor antigen presentation and promotes tumor growth. *Cell Rep* 44, 115150. 10.1016/j.celrep.2024.115150.

List of Presentation

伊藤能永 Addressing Tumor Heterogeneity by Sensitizing Resistant Cancer Cells to T cell-Secreted Cytokines. 第 33 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2024 年 6 月 15 日

伊藤能永 Addressing Tumor Heterogeneity by Sensitizing Resistant Cancer Cells to T cell-Secreted Cytokines. 第 52 回日本臨床免疫学会学術集会、東京、2024 年 10 月 10 日

伊藤能永 Immune responses to “self”. 第 9 回 Clinical Immunology/Inflammation Seminar in Shinanomachi (招待講演)、オンライン、2025 年 2 月 3 日

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) の役割の解明、(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) 自己免疫疾患の原因・発症機構の理解、をめざしている。2024 年度は、自己免疫応答制御における Treg の役割について研究を進めた。

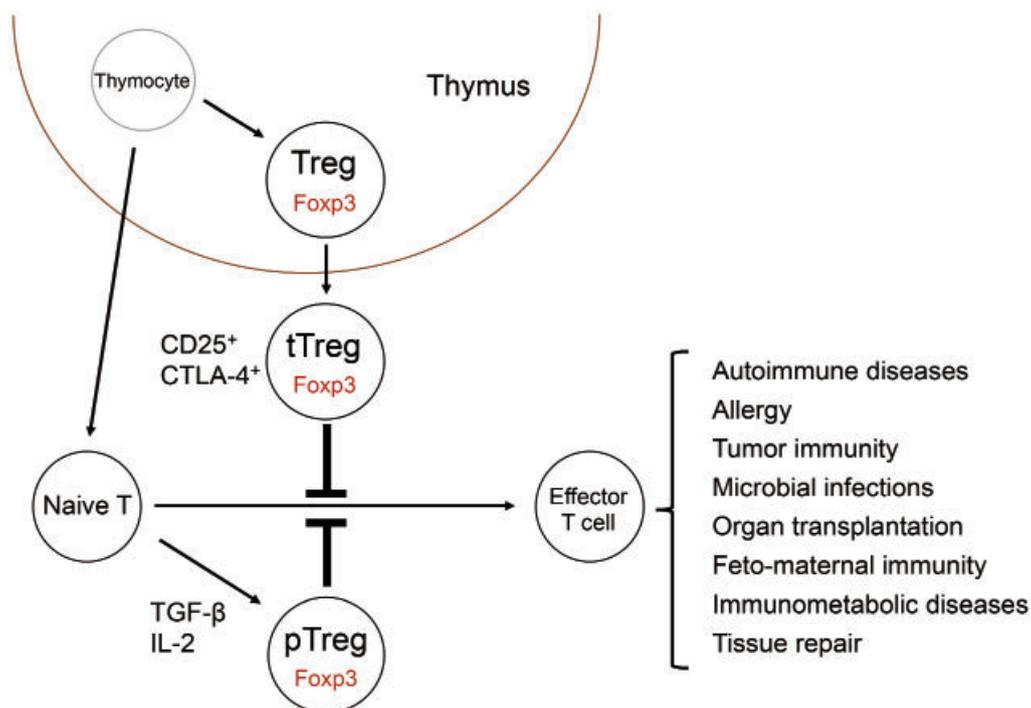


Figure. Control of physiological and pathological immune responses by Treg cells
(Cited from Kawakami & Sakaguchi, Adv Exp Med Biol. 2024)

制御性 T 細胞 (Treg) は、CD4 陽性 T 細胞の中でも免疫応答を抑制的に制御する機能的に特異なサブセットであり、自己免疫寛容と恒常性の維持において必須の役割を果たしている。Forkhead Box Protein P3 P3 (FoxP3) は Treg 細胞の機能に不可欠な転写因子であり、FOXP3 機能喪失型変異は、Treg 細胞の欠如または機能不全によって、自己免疫疾患・アレルギー等のさまざまな免疫疾患を引

き起こすことがマウス・ヒトともに知られている。FoxP3 は他の転写因子やエピジェネティック制御因子など多数の Co-Factor と相互作用し、巨大なタンパク質複合体を形成する。T 細胞受容体 (TCR) 刺激を受けると、FoxP3 複合体の標的遺伝子は発現抑制 (例: *Il2*、*Ifng*) または発現促進 (例: *Il2ra*、*Ctla4*) される。Treg 細胞の発生から成熟に至る分化過程において、FoxP3 複合体が標的遺伝子の活性化または抑制にどのように直接作用しているのか、また Foxp3 が他の転写因子、共活性化因子、共抑制因子とどのように相互作用して Treg 細胞の機能を制御しているかは未解明であった。

Ikaros 転写因子ファミリーには、Ikaros (Ikzf1)、Helios (Ikzf2)、Aiolos (Ikzf3)、Eos (Ikzf4)、Pegasus (Ikzf5) の 5 つのメンバーが存在する。これらはいずれも 2 つの進化的保存性の高い C2H2 型ジンクフィンガーモチーフを持ち、造血および獲得免疫系において重要な役割を果たしている。Ikzf5 を除く他のファミリーメンバーは Treg 細胞に高発現して FoxP3 と会合していることが報告されている。特に、Helios は Treg 細胞の安定性に、Eos は免疫抑制機能に寄与する。最近の機能変異導入解析では、Ikzf1 結合モチーフの変異が Treg 特異的な DNA 上のオープンクロマチン領域の構成を損なうことが示された。さらに、ヒトにおいては、IKZF1 のエクソン 5 領域 (IkE5) における生殖細胞系列のヘテロ接合性変異が免疫不全や自己免疫疾患を引き起こすという報告もある。これらのマウスおよびヒトにおける知見から、当研究室では Treg における IKZF1 および IKZF3 の免疫抑制能における機能や、それらの FoxP3 複合体形成の破綻が自己免疫疾患の原因となりうるかを検討してきた。

我々は今年、転写因子 Ikzf1 がそのエクソン 5 (IkE5) を介して FoxP3 と結合すること、そして IkE5 欠損 Treg 細胞では、通常 FoxP3 によって TCR 刺激下で抑制される *Ifng* 遺伝子等が高発現することを明らかにした。Treg 特異的な IkE5 欠損は、IFN- γ の過剰産生を引き起こし、それが Foxp3 発現を不安定化させ、Treg の抑制機能を損ない、全身性自己免疫疾患を誘発した。同時に、強力な抗腫瘍免疫も惹起された。さらに、IKZF1 および IKZF3 を分解する薬剤であるポマリドミドは、ヒト Treg 細胞においても IFN- γ の過剰産生を誘導した。さらに、Foxp3-Ikzf1-Ikzf3 複合体は、エピジェネティック共活性化因子である p300 などとの結合を競合的に排除し、クロマチンリモデリングを通じて標的遺伝子座における転写抑制を担っていることが明らかとなった。これらの知見から、Ikzf1 と Foxp3 の結合は Foxp3 の転写抑制機能に不可欠であり、この相互作用は、特にがんや自己免疫疾患の文脈において、生理的および病的な免疫応答を薬理的に制御するための有望な標的となり得ることが示された。

Regulatory T (Treg) cells are a functionally distinct CD4+ T-cell subset that plays crucial roles in maintaining immunological self-tolerance and homeostasis by suppressing aberrant or excessive immune responses. The transcription factor (TF) forkhead box protein P3 (FoxP3) is essential for Treg cell function and its loss-of-function mutations cause various immunological diseases such as autoimmunity, allergy and

immunopathology in mice and humans primarily due to Treg cell deficiency or dysfunction. Foxp3 forms a large protein complex by interacting with many cofactors, including other TFs and epigenetic regulators. Upon T cell receptor (TCR) stimulation, target genes of the Foxp3 complex are either repressed (e.g., *Il2* and *Ifng*) or activated (e.g., *Il2ra* and *Ctla4*). However, it is still unclear how Foxp3 complex acts directly on its target genes to activate or repress in various Treg cell states from development to maturation, and how the interactions of Foxp3 with other TFs, co-activators, and co-repressors control Treg cell function.

The Ikaros TF family has five distinct members: Ikaros (encoded by *Ikzf1*), Helios (*Ikzf2*), Aiolos (*Ikzf3*), Eos (*Ikzf4*), and Pegasus (*Ikzf5*). All are characterized by two sets of highly conserved C2H2 zinc-finger motifs and are crucial for hematopoiesis and adaptive immunity. *Ikzf* family members, except *Ikzf5*, are highly expressed in Treg cells and are physically associated with Foxp3. In particular, Helios and Eos contribute to the stability and suppressive function of Treg cells, respectively. Interestingly, a recent attempt through comprehensive mutagenesis showed that variations in the *Ikzf1*-binding motifs impaired Treg-specific chromatin accessibility. There is also evidence that germline heterozygous mutations in IKZF1, especially in the exon 5 region of IKZF1 (called *IkE5*), cause immunodeficiency and autoimmune diseases in humans. These findings in mice and humans have prompted us to determine how *Ikzf1* and *Ikzf3* contribute to Treg cell function and how anomalies in their interactions with Foxp3 may be underlying causes of autoimmune diseases.

We have shown this year that the transcription factor *Ikzf1* associates with Foxp3 via its exon 5 (*IkE5*) and that *IkE5*-deficient Treg cells highly expressed the genes, including *Ifng*, which would otherwise be repressed by Foxp3 upon TCR stimulation. Treg-specific *IkE5*-deletion indeed incurred IFN- γ overproduction, which destabilized Foxp3 expression and impaired Treg suppressive function, causing systemic autoimmune disease. It also evoked strong anti-tumor immunity. In addition, Pomalidomide, which degrades IKZF1 and IKZF3, induced IFN- γ overproduction in human Treg cells. Mechanistically, the Foxp3-*Ikzf1*-*Ikzf3* complex exerted gene-repression by competing with epigenetic co-activators, such as p300, for binding to target gene loci via chromatin remodeling. Collectively, the association of *Ikzf1* with Foxp3 is essential for the gene-repressive aspect of Foxp3 function and that the interaction can be a potential target to pharmaceutically control physiological and pathological immune responses, especially in cancer and autoimmune disease settings.

List of Publications

Yasumizu, Y., Hagiwara, M., Umezu, Y., Fuji, H., Iwaisako, K., Asagiri, M., Uemoto, S., Nakamura, Y., Thul, S., Ueyama, A., Yokoi, K., Tanemura, A., Nose, Y., Saito, T., Wada, H., Kakuda, M., Kohara, M., Nojima, S., Morii, E., Doki, Y., Sakaguchi, S., and Ohkura, N. (2024). Neural-net-based cell deconvolution from DNA methylation reveals tumor microenvironment associated with cancer prognosis. *NAR Cancer* 6 (2):zcae022. 10.1093/narcan/zcae022

Ahmed, A., Joseph, A.M., Zhou, J., Horn, V., Uddin, J., Lyu, M., Goc, J.; JRI Live Cell Bank; Sockolow,

- R.E., Wing, J.B., Vivier, E., Sakaguchi, S., and Sonnenberg, G.F. (2024). CTLA-4-expressing ILC3s restrain interleukin-23-mediated inflammation. *Nature* 630 (8018):976–983. 10.1038/s41586-024-07537-3
- Pavillon, N., Lim, E.L., Tanaka, A., Hori, S., Sakaguchi, S., and Smith, N.I. (2024). Non-invasive detection of regulatory T cells with Raman spectroscopy. *Sci. Rep.* 14 (1):14025. 10.1038/s41598-024-64536-0
- Ichiyama, K., Long, J., Kobayashi, Y., Horita, Y., Kinoshita, T., Nakamura, Y., Kominami, C., Georgopoulos, K., Sakaguchi, S. (2024). Transcription factor Ikzf1 associates with Foxp3 to repress gene expression in Treg cells and limit autoimmunity and anti-tumor immunity. *Immunity* 57 (9):2043–2060.e10. 10.1016/j.immuni.2024.07.010
- Mori, S., Kohyama, M., Yasumizu, Y., Tada, A., Tanzawa, K., Shishido, T., Kishida, K., Jin, H., Nishide, M., Kawada, S., Motooka, D., Okuzaki, D., Naito, R., Nakai, W., Kanda, T., Murata, T., Terao, C., Ohmura, K., Arase, N., Kurosaki, T., Fujimoto, M., Suenaga, T., Kumanogoh, A., , Ogawa, Y., and Arase, H. (2024). Neoself-antigens are the primary target for autoreactive T cells in human lupus. *Cell* 187 (21):6071–6087.e20. 10.1016/j.cell.2024.08.025
- Kawakami, R., Sakaguchi, S. (2024). Regulatory T Cells for Control of Autoimmunity. *Adv Exp Med Biol.* 2024:1444:67-82. doi: 10.1007/978-981-99-9781-7_5.
- Fujimoto, H., Kimura-Kataoka, K., Takeuchi, A., Yoshimiya, M., Kawakami, R., Evaluation of age estimation using alveolar bone images. *Forensic Sci Int.* 2024 Nov:364:112237. doi: 10.1016/j.forsciint.2024.112237. Epub 2024 Sep 27.
- Kuratani, A., Okamoto, M., Kishida, K., Okuzaki, D., Sasai, M., Sakaguchi, S., Arase, H., and Yamamoto, M. (2024). Platelet factor 4-induced TH1-Treg polarization suppresses antitumor immunity. *Science* 386 (6724):eadn8608. 10.1126/science.adn8608
- Søndergaard, J.N., Tulyeu, J., Priest, D., Sakaguchi, S., and Wing, J.B. (2025). Single cell suppression profiling of human regulatory T cells. *Nat. Commun.* 16 (1):1325. 10.1038/s41467-024-55746-1
- Ise, W., Koike, T., Shimada, N., Yamamoto, H., Tai, Y., Shirai, T., Kawakami, R., Kuwabara, M., Kawai, C., Shida, K., Inoue, T., Hojo, N., Ichiyama, K., Sakaguchi, S., Shiroguchi, K., Suzuki, K., and Kurosaki, T. (2025). KLF2 expression in IgG plasma cells at their induction site regulates the migration program. *J. Exp. Med.* 222 (5):e20241019. 10.1084/jem.20241019
- Chen, K.Y., Kibayashi, T., Gigueley, A., Hata, M., Nakajima, S., Mikami, N., Takeshima, Y., Ichiyama, K., Omiya, R., Ludwig, L.S., Hattori, K., Sakaguchi, S. (2025). Genome-wide CRISPR screen in human T cells reveals regulators of FOXP3. *Nature*. 10.1038/s41586-025-08795-5

List of Presentations

Shimon Sakaguchi: Immune tolerance and regulatory T cells. Seminar at Charles University (2024.6.20.

Prague, Czech)

Shimon Sakaguchi: Induction of antigen-specific and functionally stable Tregs from effector/memory T cells for adoptive cell therapy of autoimmune disease. International LIT Symposium “Synthetic Immunology / Synthetic Biology” (2024.6.26-27. Regensburg, Germany)

Ryoji Kawakami et al.: A non-canonical Treg cell development pathway diverging from CD25-Foxp3- pre-precursor stage in the thymus. The 1st Annual Meeting of Japanese Cytokine Society 2024; JCS2025 (2024.7.23-25. Sapporo, Japan)

Shimon Sakaguchi: Treg therapy of immunological diseases by converting disease-mediating T cells into Tregs. The 1st Annual Meeting of the Japanese Cytokine Society (2024.7.25. Sapporo, Japan)

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells (Tregs) in Cancer: The Science, Trials, and Future. 2024 ASCO Breakthrough (2024.8.10. Yokohama, Japan)

Shimon Sakaguchi: Treg 2024. The promise of Interleukin-2 Therapy (2024.9.4-7. Paris, France)

Shimon Sakaguchi: Treatment of autoimmune disease by converting disease-mediating T cells into Treg cells. The 3rd UCL - OU IFRc joint Symposium on Immunology (2024.9.26. 大阪)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫疾患の制御 第 52 回日本臨床免疫学会総会 (2024.10.10-12. 東京)

Shimon Sakaguchi: Treatment of autoimmune disease by converting disease-mediating T cells into Treg cells. 日独免疫ワークショップ (2024.11.28-12.1. 奈良)

Ryoji Kawakami et al.: Possible diversity of Treg cell development pathways branching from CD25^{neg}Foxp3^{neg} pre-precursor stage in the thymus. The JSI 53th annual meeting. (2024.12.5-7. Nagasaki, Japan)

坂口志文：制御性 T 細胞を標的とする免疫医療の展望 NIBIOHN セミナー (2025.1.24. 大阪)

Ryoji Kawakami.: Keystone Symposia: T Cell Differentiation in Tissue Microenvironments (2025.2.2-2.5. Vancouver, BC, Canada)

Shimon Sakaguchi: Conversion of disease-mediating T cells into Tregs for treatment of immunological diseases. The 3rd Keio University WPI-Bio2Q International Symposium (2025.3.6-7. 東京)

(賞)

The Garnet Immunoglobulin Award from the Czech Immunological Society

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
助教	牧 功一郎	Assist. Prof.	Koichiro Maki
助教	金 英寛	Assist. Prof.	Young Kwan Kim
助教	竹田 宏典	Assist. Prof.	Hironori Takeda
助教	澄田 裕美	Assist. Prof.	Hiromi Sumita

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。2024年度においては、多細胞組織の細胞レベルの応答や組織としての力学挙動を連成させることのできる新しい数理モデリング・計算機シミュレーション手法を構築した。これを長骨の成長板ダイナミクスに適用することで、軟骨細胞の肥大により生じる組織内応力場が、長骨の形態形成を制御することを示した。

骨形態形成過程の成長板における軟骨細胞の肥大は、応力場に応じた軟骨カラム形成を介して骨伸長を制御する

大腿骨や中足骨などの長骨の長さ方向への成長は、形態形成過程において、一次海綿骨の両端に形成される成長板での細胞動態により制御される。成長板は、骨端側から増殖軟骨細胞層、前肥大軟骨細胞層、および、肥大軟骨細胞層が重なった構造であり、その増殖層では分裂後の細胞が骨の長軸方向に並びカラムを形成することが知られている。この軟骨カラム内の細胞が後に肥大することにより、骨の長軸方向への成長が制御される。増殖層内の軟骨細胞のカラム形成や分化は、生化学的なシグナルだけでなく、周囲組織から及ぼされる力学刺激の影響を受ける。しかし、形成過程の骨組織内部における力学状態を計測することは困難であり、力学的な要因が細胞動態を時空間的に制御するメカニズムは十分に理解されていない。本研究では、我々がこれまでに開発した連続体ベース粒子モデルを用いて、骨形態形成過程の増殖軟骨細胞層における応力場を解析し、軟骨カラム形成を介した長骨長さの制御メカニズムを解明することを目指した。そのために、生化学的シグナル分子の産生・拡散に応じた細胞分化を記述する単因子モデルを構築し、連続体ベース粒子モデルに導入した。これにより、骨形態形成過程における成長板構造の形成と維持、および、その結果としての骨伸長が再現された。本シミュレーションにおける応力解析の結果、成長板の増殖軟骨細胞層において、骨の横断面内に引張応力が生じていることが明らかとなった。一方、骨の長軸方向

の応力は圧縮であったため、増殖後の細胞は細胞間接着力に起因する配置換えにより骨の長軸方向に整列することにより、軟骨カラムを形成した。また、前肥大軟骨細胞層、および、肥大軟骨細胞層における細胞肥大を阻害した解析を行った結果、骨の横断面内応力が圧縮に転じたことから、カラム形成を誘導する骨横断面内の引張応力が軟骨細胞の肥大により引き起こされることが明らかとなった。今後、さらなる解析により、筋肉などの周囲組織から骨に作用する力が、成長板内応力場の変化を介し骨形態形成に影響を及ぼすメカニズムが明らかになると期待される。

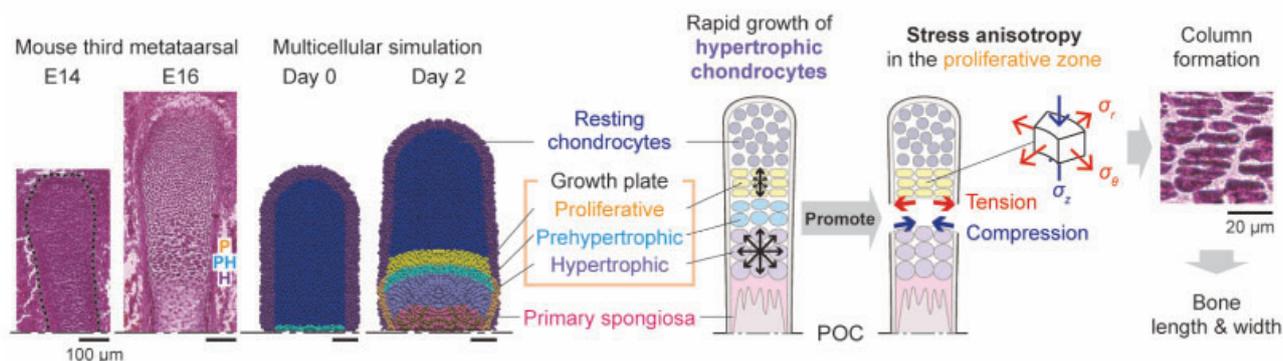


Fig. 1. Multicellular simulation of bone morphogenesis and proposed mechanism of longitudinal bone growth. Difference in growth rate between the proliferative and hypertrophic zones induces tension exerted on the proliferative zone and compression exerted on the hypertrophic zone. Thus, stress anisotropy in the proliferative zone affects bone development through chondrocyte column formation. Created by modifying Graphical Abstract in Ref (Yokoyama *et al.*, 2024 (Licensed under CC BY 4.0)).

Chondrocyte hypertrophy in the growth plate promotes stress anisotropy affecting long bone development through chondrocyte column formation

The length of long bones is determined by column formation of proliferative chondrocytes and subsequent chondrocyte hypertrophy in the growth plate during bone development. Despite the importance of mechanical loading in long bone development, the mechanical conditions of the cells within the growth plate, such as the stress field, remain unclear due to the difficulty in investigating spatiotemporal changes within dynamically growing tissues. This study investigated the mechanisms of longitudinal bone growth from a mechanical perspective through column formation of proliferative chondrocytes within the growth plate using continuum-based particle models (CbPMs). A one-factor model describing essential aspects of a biological signaling cascade regulating cell activities within the growth plate was developed and incorporated into CbPM. Subsequently, the developmental process and maintenance of the growth plate structure and resulting bone morphogenesis were simulated. Thus, stress anisotropy in the proliferative zone that affects bone elongation through chondrocyte column formation was identified and found to be promoted by chondrocyte hypertrophy. These results provide further insights into the mechanical regulation of multicellular dynamics during bone development.

List of Publications

1. 論文

- Shibusaka, K., Negishi, S., Sakai, N., Kim, Y.K., Okada, H., Yano, F. (2025). Synergistic Effects of Estrogen Deficiency and Articular Disk Derangement on Condylar Bone Loss. **Journal of Oral Biosciences**, Vol. 67, No. 1, 100616.
- Xinyi, Y., Kawakami, R., Yambe, S., Yoshimoto, Y., Sasaki, T., Higuchi, S., Watanabe, H., Akiyama, H., Miura, H., Hu, K., Kondoh, G., Sagasaki, R., Inui, M., Adachi, T., Docheva, D., Imamura, T., Shukunami, C. (2025). Dynamic Interactions between Cartilaginous and Tendinous/ligamentous Primordia during Musculoskeletal Integration. **Development**, Vol. 152, No. 6, dev204512.
- Nakazawa, N., Greci, G., Kameo, Y., Takeda, N., Sawada, T., Kurisu, J., Zhang, Z., Toma, K., Adachi, T., Nonomura, K., Kengaku, M. (2025). PIEZO1-dependent Mode Switch of Neuronal Migration in Eterogenous Microenvironments in the Developing Brain. **Cell Reports**, Vol. 44, No. 3, p. 115405.
- Stoop, J., Yokoyama, Y., Adachi, T. (2025). Timing of Resting Zone Parathyroid Hormone-related Protein Expression Affects Maintenance of the Growth Plate during Secondary Ossification: A Computational Study. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, Vol. 24, pp. 125-137.
- Maki, K., Fukute, J., Adachi, T. (2024). Imaging Reveals Nucleolar Encapsulation by Single-stranded DNA. **Journal of Cell Science**, Vol. 137, No. 20, jcs262039.
- Suzuki, R., Kameo, Y., Adachi, T. (2024). Modeling a Triclinic Lattice Elastic Body based on the Linear Couple Stress Theory. **International Journal of Solids and Structures**, Vol. 302 #112923.
- Tomida, K., Kim, J., Maeda, E., Adachi, T., Matsumoto, T. (2024). Spatiotemporal Analysis of Multi-scale Cell structure in Spheroid Culture Reveals Hypertrophic Chondrocyte Differentiation. **Cell and Tissue Research**, Vol. 397, pp. 263-274.
- Yambe, S., Yoshimoto, Y., Ikeda, K., Maki, K., Takimoto, A., Tokuyama, A., Higuchi, S., Yu, X., Uchibe, K., Miura, S., Watanabe, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Tanimoto, K., Kondoh, G., Kasahara, M., Mizoguchi, T., Docheva, D., Adachi, T., Shukunami, C. (2024). Sclerostin Modulates Mineralization Degree and Stiffness Profile in the Fibrocartilaginous Enthesis for Mechanical Tissue Integrity. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Vol. 12, 1360041.
- Yoshimoto, K., Maki, K., Adachi, T., Kamei, K. (2024). Cyclic Stretching Enhances Angiocrine Signals at Liver Bud Stage from Human Pluripotent Stem Cells in Two-Dimensional Culture. **Tissue Engineering Part A**, Vol. 30, No. 9-10, pp. 426-439.
- Hayashi, T., Takeda, H., Ishida, S., Imai, Y. (2024). Folding of a Growing Hyperelastic Sheet in a Viscous Fluid. **Physics of Fluids**, Vol. 36, No. 5, 053315.
- Yokoyama, Y., Kameo, Y., Sunaga, J., Maki, K., Adachi, T. (2024). Chondrocyte Hypertrophy in the Growth Plate Promotes Stress Anisotropy Affecting Long Bone Development through Chondrocyte Column

Formation. **Bone**, Vol. 183, #117055.

2. 書籍・総説等

- キム・ジョンヒョン、安達泰治、松本健郎 (2024.8). 三次元培養技術を用いた骨細胞分化メカニズムの解明、オルガノイド研究：培養・作製、活用、臨床応用 (監修：谷口英樹)、pp.199-207.
- 金英寛、安達泰治 (2024.4). 数理・計算科学による骨リモデリングの *in silico* 実験：応用 骨・軟骨・筋科学 Update、日本骨代謝学会第6号、pp. 18-21.

List of Presentations

1. 特別講演・シンポジウム

- Adachi, T. *In Silico* Study on Mechanical Adaptation and Microdamage Repair in Bone by Remodeling. <Keynote Talk> 18th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME2024), Singapore. December 9-12, 2024.
- Yokoyama, Y. Mechanical Regulation of Long Bone Development through Multicellular Dynamics. <Invited> Japan Bone Academy, Tokyo. December 7-8, 2024.
- Yoshimoto, K. Angiogenesis Enhanced by Cyclic Stretching in Human ES Cell-Derived Liver Organoids. <Invited> The 30th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research (EAJS), Taipei, Taiwan. October 29-November 1, 2024.
- Yokoyama, Y., Kameo, Y., Sunaga, J., Maki, K., Adachi, T. Mechanical Stress Analysis in the Growth Plate toward Understanding the Mechanism of Long Bone Development. <Workshop Speaker> EMBO Workshop, Limb Development: Fundamental Mechanisms, Evolution, Disease and Regeneration, 55, Dresden, Germany. June 17-24, 2024.
- Maki, K. Mechanical Behaviors of DNA-protein Complexes. <Invited> KSME Bioengineering Conference, KSME-JSME Joint Session, Yeosu, Korea. April 24-25, 2024.
- 牧功一郎 マルチスケール力学計測とバイオロジーの接点. <Workshop> Bruker BioAFM User Meeting、大阪、2024年11月12日
- 安達泰治 骨の形態適応と損傷修復における骨細胞のメカノバイオロジー：in vitro/in silico 実験. <Symposium> 日本臨床バイオメカニクス学会第51回学術集会、シンポジウム3: 運動器のメカノバイオロジー、S3-5、箕面、2024年11月1日-2日
- Maki, K. DNA Untwisting and Melting under Intranuclear Mechanical Forces. <Invited lecture> Cell, Developmental, and Systems Biology Course Meeting, Kyoto, Japan. November 1, 2024.
- Takeda, H., Asai, Y., Ishida, S., Imai, Y. Fluid-flow-induced Wrinkling of a Capsule Membrane: An Isogeometric Analysis. <Invited> 4th International Workshops on Advances in Computational

Mechanics (IWACOM-IV), Kitakyushu, Japan. September 18-20, 2024.

Imai, Y., Hayashi, T., Takeda, H., Ishida, S. Folds Emerging from Fluid–structure Interaction of Sheets with Surrounding Fluids. <Invited> 4th International Workshops on Advances in Computational Mechanics (IWACOM-IV), Kitakyushu, Japan, September 18-20, 2024.

Kameo, Y., Yokoyama, Y., Adachi, T. A Continuum-based Particle Model for Linking Multicellular Dynamics to Tissue Morphogenesis. <Invited> 4th International Workshops on Advances in Computational Mechanics (IWACOM-IV), Kitakyushu, Japan. September 18-20, 2024.

Kim, J., Tomida, K., Maeda, E., Adachi, T., Matsumoto, T. Assays for Biomechanical Analysis of Spheroid Culture Model. <Invited> The 10th International Conference on Mechanics and Materials in Design 2024 (M2D2024), Nagoya, Japan. September 4, 2024.

牧功一郎 Mechanical Behaviors of DNA-protein Complex in Cell Nucleus. <Symposium> 第25回京都大学生命科学研究科シンポジウム、京都、2024年6月12日

牧功一郎、福手淳平、蟹川修、安達泰治 静水圧負荷がクロマチン構造変化を導くひとつの道筋：分子複合体に着目して。 <Symposium> 日本機械学会 第36回バイオエンジニアリング講演会、名古屋、2024年5月11日-12日

2. 学会講演

Kim, Y. K., Kameo, Y., Tanaka, S., Adachi, T. Drug-specific Effects of Anabolic Agents on the Mechanical Adaptability of Bone: An In Silico Experimental Study. American Society for Bone and Mineral Research 2024 Annual Meeting (ASBMR2024), Poster # SUN-147, Toronto, Canada, September 27-30, 2024.

Shibusaka, K., Okada, H., Terashima, A., Maemura, M., Negishi, S., Sakai, N., Yoshida, H., Kim, Y. K., Suzuki, Y., Yano, F. Subcellular Spatial Transcriptomics and Single-cell RNA Sequencing Analysis Reveal the Role of the Posterior Synovium in the Temporomandibular Joint. American Society for Bone and Mineral Research 2024 Annual Meeting (ASBMR2024), Plenary Poster # FRI-217, Toronto, Canada, September 27-30, 2024.

Adachi, T., Muto, T., Kim, Y. K., Kameo, Y. Modeling Targeted Bone Remodeling and Voxel-based Computer Simulation. 16th World Congress on Computational Mechanics (WCCM2024) and 4th Pan American Congress on Computational Mechanics (PANACM2024), MS0510 - Computational Mechanobiology of Musculoskeletal Tissues, W242043, Vancouver, Canada, July 21-26, 2024.

Yokoyama, Y., Kameo, Y., Adachi, T. Continuum-based Particle Modeling for Elastic Analysis of Multicellular Tissue Morphogenesis. 16th World Congress on Computational Mechanics (WCCM2024) and 4th Pan American Congress on Computational Mechanics (PANACM2024), MS502 - Advances in Computational Biomechanics and Mechanobiology, W242120, Vancouver, Canada, July 21-26, 2024.

- Kanda, E., Epureanu, B. I., Adachi, T., Sasaki, T., Kashihara, N. Vector Field Model of CKD Stage and Its Directional Derivative Mathematically Enable Accurate Kidney Prognosis Prediction. The 2024 SIAM Annual Meeting, TH-PO1021, Spokane, Washington, July 18-24, 2024.
- Yokoyama, Y., Kameo, Y., Sunaga, J., Maki, K., Adachi, T. The Regulatory Mechanism of Long Bone Development through Mechanical Stress Anisotropy Promoted by Chondrocyte Hypertrophy. Society for Developmental Biology 83rd Annual Meeting, #375, poster, Atlanta, GA, USA, July 14-17, 2024.
- Kameo, Y., Sawada, T., Nakazawa, N., Kengaku, M., Adachi, T. Mechanical Modeling to Understand Neuronal Migration in Confined Microenvironments. 29th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2024), 9.6: Cellular and molecular biomechanics I: Cell-cell and cell microenvironment interactions, 437, Edinburgh, Scotland, June 30-July 3, 2024.
- Suzuki, R., Adachi, T. Theoretical Approach to Morphological Changes Driving Mechanical Adaptation of Interacting Multiple Bone. 29th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2024), 3.1: Hard tissue biomechanics I, 794, Edinburgh, Scotland, June 30-July 3, 2024.
- Kim, Y. K., Kameo, Y., Tanaka, S., Adachi, T. In Silico Investigation of Variability in Bone Cell Activities Based on Progenitor Dynamics. 29th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2024), 5.4: Computational biology I, 1018, Edinburgh, Scotland, June 30-July 3, 2024.
- Yokoyama, Y., Kameo, Y., Adachi, T. Simulation of Growth Plate Development during Bone Morphogenesis by the One-factor Model. 29th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2024), 5.4: Computational biology I, 1120, Edinburgh, Scotland, June 30-July 3, 2024.
- Yoshimoto, K., Imamura, S., Maki, K., Adachi, T., Kamei, K. Cyclic Mechanical Stimuli with a Strain-controllable Device Induces Angiocrine Signals during Liver Bud Stage. International Society for Stem Cell Research (ISSCR2024) Annual Meeting, #219, poster, Hamburg, Germany, July 10-13, 2024.
- Fukute, J., Maki, K., Adachi, T. DNA Underwinding Mechanism in Mammalian Cells. EuroEvoDevo2024, Poster, #199, Helsinki, Finland, June 25-28, 2024.
- Maki, K., Fukute, J., Adachi, T. DNA Untwisting and Melting by in situ Super-Resolution Microscopy. EMBO Workshop: Chromatin Dynamics and Nuclear Organization in Genome Maintenance Leiden, Netherlands, Poster, June 17-20, 2024.
- Kim, J., Tomida, K., Maeda, E., Adachi, T., Matsumoto, T. Spatiotemporal Analysis for Hypertrophic Chondrocyte Differentiation in Spheroid Culture. Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (SB3C2024), Lake Geneva, WI, US, Poster, June 11-14, 2024.
- Fukute, J., Maki, K., Adachi, T. DNA Underwinding in the Mechanical Environment of the Nucleolus. EMBO Workshop (Nuclear Mechano-Genomics), Sardegna, Italy, April 16-19, 2024.
- 吉本昂希、今村聡、牧功一郎、安達泰治、亀井謙一郎 ヒト ES 細胞由来の肝芽オルガノイドにお

いて力学刺激が促進する血管形成 第 24 回日本再生医療学会総会、P-01-1、横浜、2025 年 3 月 20 日 -22 日

長谷川太一、牧功一郎、福手淳平、安達 泰治 NPM 分子との相互作用を介した DNA アンツイスティング 日本機械学会第 35 回バイオフィロンティア講演会、No. 24-61、1A01、横浜、2024 年 12 月 14 日 -15 日

Zou Zhixin、牧功一郎、大友瞳、安達泰治 張力作用下におけるヌクレオソーム展開の初期挙動にヒストン末端切断が与える影響 日本機械学会第 35 回バイオフィロンティア講演会、No. 24-61、1A14、横浜、2024 年 12 月 14 日 -15 日

鈴木龍之介、小西省吾、安達泰治 骨形状の形成過程において関節機能に関与する力学的相互作用の数理モデリング 日本機械学会第 35 回バイオフィロンティア講演会、No. 24-61、1B06、横浜、2024 年 12 月 14 日 -15 日

大友瞳、牧功一郎、安達泰治 老化骨組織中の骨細胞核内 DNA に対するヒストン結合量評価 日本機械学会第 35 回バイオフィロンティア講演会、No. 24-61、1B16、横浜、2024 年 12 月 14 日 -15 日

上平拓夢、須長純子、安達泰治 力学応答性 miRNA とその標的 mRNA の網羅的な探索手法の確立 日本機械学会第 35 回バイオフィロンティア講演会、No. 24-61、2A10、横浜、2024 年 12 月 14 日 -15 日

長田侑、Frey Tanita、牧功一郎、安達泰治、岸雄介 核の形態的・物理的性質によるニューロン機能への影響 第 47 回日本分子生物学会年会、1P-341、福岡、2024 年 11 月 27 日 -29 日

Kameo, Y., Hanatani, I., Adachi, T. Mechanical Analysis of the Effects of Spatial Heterogeneity in Cerebellar Cortical Growth on Lobule Formation. Asia-Pacific Conference on Fracture and Strength 2024 (APCFS 2024), E205, Shimane, November 25-29, 2024.

金英寛、亀尾佳貴、田中栄、安達泰治 細胞系譜を考慮した骨リモデリング制御機構の数理解析 第 51 回日本臨床バイオメカニクス学会、O24-3、箕面、2024 年 11 月 1 日 -2 日

武藤剛嗣、金英寛、亀尾佳貴、安達泰治 力学荷重が骨損傷状態と骨梁構造の変化に及ぼす影響の *in silico* 評価 第 51 回日本臨床バイオメカニクス学会、O24-6、箕面、2024 年 11 月 1 日 -2 日

金英寛、亀尾佳貴、田中栄、安達泰治 アプローチによる前駆細胞動態に基づく骨代謝回転変動機構の探究 第 39 回日本整形外科学会基礎学術集会、新宿、2024 年 10 月 17 日 -18 日

Yambe, S., Yoshimoto, Y., Maki, K., Yu, X., Miura, S., Mizoguchi, T., Adachi, T., Shukunami, C. Sclerostin is a Modulator of Mineralization Degree and Stiffness Profile in the Fibrocartilaginous Enthesis for Mechanical Tissue Integrity. Joint Conference of the 22nd Annual Meeting of Asian and Oceanian Myology Center and the 10th Annual Meeting of Japan Muscle Society (AOMC-JMS 2024), Nara, September 12-15, 2024.

Yu, X., Kawakami, R., Yambe, S., Yoshimoto, Y., Sasaki, T., Akiyama, H., Adachi, T., Imamura, T., Shukunami, C. Visualization of Dynamic Interactions between Cartilaginous and Tendinous/ligamentous Primordia during Musculoskeletal Development. Joint Conference of the 22nd Annual Meeting of Asian and Oceanian Myology Center and the 10th Annual Meeting of Japan Muscle Society (AOMC-JMS 2024), Nara, September 12-15, 2024.

濱崎彩葉、須長純子、吉本昂希、牧功一郎、安達泰治 組織内細胞動態観察を目指したマウス胎児長骨への力学的負荷実験系の構築 日本機械学会 2024 年度年次大会、S022-03、松山、2024 年 9 月 9 日 -11 日

井町圭輔、須長純子、牧功一郎、安達泰治 力学環境下の骨系細胞に由来するエクソソーム内包シグナルの評価 日本機械学会 2024 年度年次大会、S022-05、松山、2024 年 9 月 9 日 -11 日

上平拓夢、須長純子、安達泰治 メカノ miRNA とその標的 mRNA のデータ駆動探索 日本機械学会 2024 年度年次大会、S022-07、松山、2024 年 9 月 9 日 -11 日

Kim, J., Tomida, K., Maeda, E., Adachi, T., Matsumoto, T. Assays for Biomechanical Analysis of Spheroid Culture Model. 10th International Conference on Mechanics and Materials in Design (M2D2024), Nagoya, September 1-5, 2024.

吉本昂希、今村聡、牧功一郎、安達泰治、亀井謙一郎 ES 細胞由来の Liver bud において周期的伸長刺激が促進する血管新生因子 第 31 回肝細胞研究会、東京、2024 年 7 月 26 日 -27 日

澁坂和夫、岡田寛之、寺島明日香、前村美希、根岸宗一郎、坂井信裕、吉田寛、金英寛、鈴木穰、矢野文子 関節円板の滑膜変性は変形性顎関節症の病態制御に寄与する 第 37 回一般社団法人日本顎関節学会学術大会、O-1、徳島、2024 年 7 月 13 日 -14 日

山家新勢、余昕怡、秋山治彦、三浦重徳、安達泰治、宿南知佐 線維軟骨性エンテシス形成に寄与する Scx+/Sox9+ 細胞における Scx の機能的役割 第 42 回日本骨代謝学会学術集会、沖縄、2024 年 6 月 29 日 -7 月 2 日

緒方駿、山家新勢、余昕怡、吉本由紀、三浦重徳、安達泰治、宿南知佐 下顎骨と咀嚼筋の成長における Scleraxis の機能的役割 第 42 回日本骨代謝学会学術集会、沖縄、2024 年 6 月 29 日 -7 月 2 日

神田英一郎、安達泰治、佐々木環、柏原直樹 自然言語処理 AI は CKD 患者の病態と生命・腎予後を反映する 第 67 回日本腎臓学会学術総会、横浜、2024 年 6 月 28 日 -30 日

Maki, K., Fukute, J., Adachi, T. Encapsulation of Cell Nucleolus by Single-stranded DNA. 21st IUPAB2024 and the 62nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Poster, Kyoto, June 24-28, 2024.

Suzuki, R., Adachi, T. Theoretical Study on Partial and Total Adaptation of Multiple Tissues under Force Interaction. 21st IUPAB2024 and the 62nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Poster, Kyoto, June 24-28, 2024.

- 安達泰治、杉本浩太郎、須長純子、牧功一郎 マイクロ流路培養系を用いた骨細胞ネットワーク形成の観察 第 47 回日本バイオレオロジー学会年会、OS4-2、早稲田、2024 年 6 月 8 日 -9 日
- 牧功一郎、福手淳平、蟹川修、安達泰治 静水圧負荷がクロマチン構造変化を導くひとつの道筋：分子複合体に着目して 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#2073、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- 蟹川修、牧功一郎、安達泰治 一本鎖 DNA とヒストン H1 が形成する液滴状態に静水圧変化が及ぼす影響 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#1P11、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- Zou Zhixin、大友瞳、牧功一郎、安達泰治 Histone clipping に着目したヌクレオソームの力学挙動解析 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#1P13、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- 鈴木龍之介、小西省吾、安達泰治 接触に基づく組み合わせ部材による力学適応的な関節形態変化の数理表現 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#1P63、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- 谷尻達哉、横山優花、金英寛、安達泰治 内部構造を有する生体組織の連続体ベース粒子法解析における応力誤差評価 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#1P72、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- 上林凌也、牧功一郎、安達泰治 流れ付与による核内 DNA の二次元展開 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#2P09、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- 長谷川太一、福手淳平、牧功一郎、安達泰治 DNA アンツイスティング機構の解明に向けた in vitro 実験系の構築 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#2P12、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- 大友瞳、牧功一郎、安達泰治 マウス骨細胞における Histone tail 切断機構の検討 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#2P23、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日
- 今西直、横山優花、金英寛、安達泰治 軟骨細胞動態が一次海綿骨の形態形成に与える影響の数理的検討 日本機械学会第 36 回バイオエンジニアリング講演会、No. 24-8、#2P72、Poster、名古屋、2024 年 5 月 11 日 -12 日

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	三井 優輔	Assist. Prof.	Yusuke Mii

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、本分野では主に多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）を用いて in vivo での細胞分化誘導法および組織形成技術の開発を行うとともに、多様な細胞の分化プロセスとそれぞれが協調して機能的器官を作る分子機構を明らかとすることを目的として研究に取り組んでいる。本年度は、マウス胎児から分離した嗅上皮細胞から嗅上皮オルガノイドを作製する培養法を確立し、嗅神経発生における基盤原理の解明に取り組んだ。またヒト ES 細胞から胎盤幹細胞を樹立することに成功し、ヒト多能性幹細胞が胚体外組織への分化ポテンシャルを維持していることを明らかとした。

1) 体性幹細胞を用いた嗅上皮オルガノイド (OE オルガノイド) 作製法の開発

ヒトを含む哺乳類にとって、外界の情報を感知し、それを処理して適切に応答することは、生存や行動において極めて重要である。中でも嗅覚は、採食、危険回避、生殖行動など基本的な生命活動を支える感覚である。この嗅覚機能を担っているのが、鼻腔内の嗅上皮に存在する嗅神経細胞 (OSN) であり、これらの細胞は嗅覚受容体 (OR) を介して匂い物質を感知し、その情報を脳へと伝達しているが、膨大な種類の匂いを嗅覚システムがどのように識別しているのかについては、神経科学における重要課題の一つとなっている。特に、OSN が数千種類におよぶ OR 遺伝子ファミリーの中からただ 1 種類の OR のみを発現するという「一細胞一受容体」の法則を可能にしている分子機構については、依然として多くの謎に包まれている。

本研究では、マウス胎児由来の嗅上皮幹細胞から、偽重層構造を

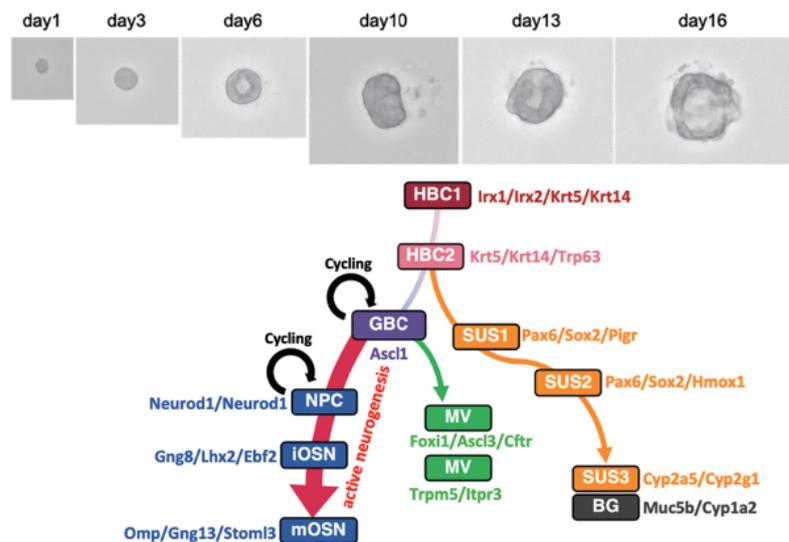


Fig.1. Olfactory organoid formation from a single stem cell

有する OE オルガノイドを形成する新たな手法を確立した。単一細胞 RNA シーケンシング解析の結果、得られた OE オルガノイドにはマウス嗅上皮を構成するすべての細胞系譜が含まれており、内部では幹細胞に由来する活発な神経新生が進行していることが明らかとなった。また、OE オルガノイド内の OSN は *in vitro* 環境において匂い刺激に応答可能であり、各 OSN が一種類の OR のみを発現するという「一細胞一受容体」のルールが再現されていることを確認した。これらの成果は、OE オルガノイドが嗅覚神経系の発生機構を解明するための有用なモデルとなる可能性を示すものである。

2) ヒト ES 細胞から胎盤幹細胞の誘導

多能性 (pluripotency) とは、胎盤をはじめとする胚体外組織を除くすべての細胞系譜に分化しうる能力を定義する概念であり、主にマウスを用いた研究により確立されたものである。ヒト ES 細胞は、着床期胚におけるエピブラストに相当する細胞状態であると考えられており、この発生段階では既に胎盤や羊膜などの胚体外組織への分化が完了していることから、ヒト ES 細胞は胚体外系譜への分化ポテンシャルを喪失していると長らくみなされてきた。しかし近年、我々を含む複数の研究グループにより、ヒト ES 細胞から胎盤特有の性質を備えた細胞を誘導可能であることが報告されており、こうした知見は従来の pluripotency の定義に再考を促すものである。

本研究では、ヒト ES 細胞の胚体外系譜への分化ポテンシャルを実証する手段として、胎盤幹細胞 (trophoblast stem; TS 細胞) の樹立を試みた。まず、ES 細胞を GATA3 陽性胚体外細胞 (GATA3⁺ ExECs) へと誘導し、既知の TS 細胞樹立条件下で継続培養した結果、自己複製能を有する幹細胞集団 (TS 様細胞) を得ることに成功した。RNA シーケンシング解析を含む分子解析により、この TS 様細胞が既存の胎盤由来 TS 細胞やヒト胎児由来の胎盤幹細胞と類似したトランスクリプトームを有することが明らかとなった。興味深いことに、GATA3⁺ ExECs 自体は自己複製能を持たないことから、TS 様細胞への細胞運命転換には、ES 細胞とは異なる文脈での自己複製能の獲得が不可欠であることが示唆された。さらに、本過程における鍵因子として転写因子 TFAP2C を同定した。これらの結果は、ヒト ES 細胞が従来の多能性の枠組みにとどまらない分化能力を有していることを示しており、ヒト特有の胚発生プログラムに基づく多能性の再定義に貢献する知見と考えられる。

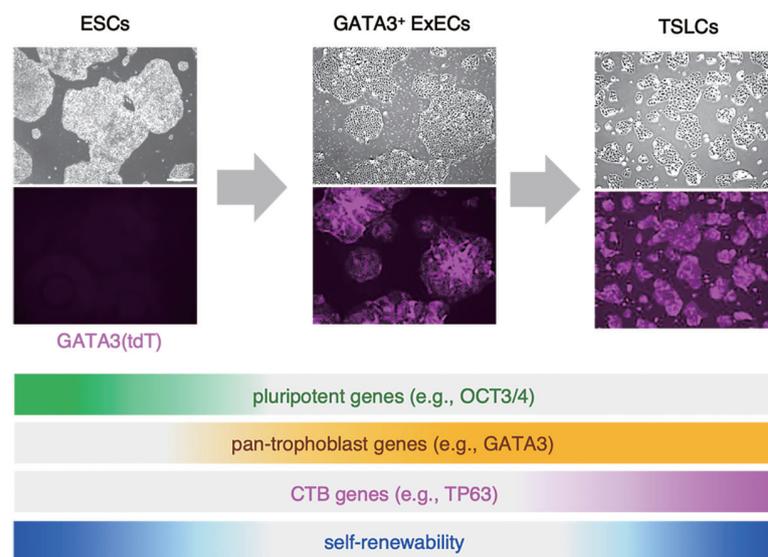


Fig. 2. The derivation of Trophoblast stem-like cells from human ESCs

The processes of organogenesis are extremely complex phenomena that involve cellular proliferation, differentiation, and migration. To gain insight into these processes, we primarily employ pluripotent stem cells (ES/iPS cells) to recapitulate the development of functional organs *in vitro*. Through these efforts, we aim to uncover the molecular mechanisms that enable the differentiation into diverse cell types and their coordination to form functional organs, thereby elucidating the principles underlying organ formation. In this year, we established a culture method for generating olfactory epithelium organoids from olfactory epithelial cells isolated from fetal mice and addressed the fundamental principles governing olfactory neurogenesis. Additionally, we successfully derived trophoblast stem cells from human ES cells, demonstrating that human pluripotent stem cells retain the potential to differentiate into extraembryonic lineages.

1) Reconstruction of functional olfactory sensory tissue from embryonic nasal stem cells

Olfaction is essential for fundamental biological activities such as foraging, danger avoidance, and reproductive behavior, and thus for the survival and reproduction of animals. This function is mediated by olfactory sensory neurons (OSNs) located in the olfactory epithelium (OE) of the nasal cavity. OSNs detect odorant molecules via odorant receptors (ORs) and transmit this information to the brain. However, how the olfactory system discriminates among an enormous variety of odorants present in the environment remains one of the central questions in biology. In particular, the molecular mechanisms that enable each OSN to express only one OR out of the several thousand OR genes, a phenomenon known as the “one-neuron–one-glomerulus” rule, remain largely elusive.

In this study, we established a novel method for generating OE organoids with a pseudostratified structure from fetal mouse OE-derived stem cells. The resulting OE can be maintained over 30 days. Single-cell RNA sequencing analysis revealed that the OE organoids contained all major OE cell lineages found *in vivo*. We also observed active neurogenesis sustained by resident stem cells and progenitor populations within the organoids. Moreover, OSNs within the OE organoids responded to odorant stimulation *in vitro*, supporting their functional competence as olfactory sensors. Strikingly, each OSN expressed only a single OR, recapitulating the “one-neuron–one-receptor” rule. These findings suggest that OE organoids may serve as a valuable model system for elucidating the developmental mechanisms of the olfactory nervous system.

2) Derivation of trophoblast stem-like cells from human ESCs.

Pluripotency is defined as the capacity to differentiate into all cellular lineages except for extraembryonic tissues such as the placenta, and this has been primarily established through studies using mouse models. Human embryonic stem (ES) cells are considered to correspond to the epiblast of post-implantation embryos, a developmental stage in which the commitment to extraembryonic lineages has already completed. Accordingly, it has long been assumed that human ES cells have lost the potential to differentiate into extraembryonic lineages. However, recent studies, including those by our group, have reported that human ES cells can generate cells exhibiting placental characteristics, prompting a re-evaluation of the conventional definition of pluripotency.

In this study, we aimed to demonstrate the potential of human ES cells to differentiate into extraembryonic lineages by establishing trophoblast stem (TS) cells. We first induced GATA3-positive extraembryonic cells (GATA3⁺ ExECs) and subsequently cultured them under established TS cell conditions, yielding a population of stem-like cells (TS-like cells) with self-renewal capacity. Through several molecular analyses, we showed that these TS-like cells exhibited transcriptomic profiles similar to those of previously established placenta-derived TS cells and human fetal trophoblast stem cells. Interestingly, because GATA3⁺ ExECs lack self-renewal ability, our findings suggest that acquisition of self-renewal competence, in a context distinct from that of ES cells, is critical for the conversion into TS-like cells. Furthermore, we identified the transcription factor TFAP2C as a key regulator of this process. Collectively, these results indicate that human ES cells possess a differentiation potential beyond the framework of conventional pluripotency, providing insights that may contribute to redefining pluripotency based on human-specific embryonic development programs.

List of Presentations

Mii, Y., Wnt11 induces PCP by mutual interaction with core PCP components. 1st Asian Xenopus Conference, Toyonaka, November 24-26, 2024

Eiraku, M. Organogenesis in stem cell culture. The 33rd Hot Spring Harbor International Symposium-Cutting-Edge Research and Technology in Stem Cells and Reprogramming-, Hakata, October 29-30, 2024

Tsutsumi, R., Plunder, S., Diez, A., Kimura, R., Oki, S., Mii, Y., Takada, R., Takada, S., Eiraku, M, Emergent Tissue Morphogenesis in Limb Development: A Synergy of 2.5D, 3D Cultures and Mathematical Modeling. 2025 RIKEN BDR-CuSTOM Joint Organoid Symposium, Kobe, March 5-7 20, 2025

Mii, Y., Understanding planar cell polarity with Xenopus and in vitro systems. RIKEN BDR Seminar, Kobe, September 20, 2024

永樂 元次, Organogenesis in stem cell culture. APPW2025 (解剖・生理・薬理合同学会) 協奏の未来へ～生命を探る・解く・護る～, 千葉市, 2025年3月17日-19日

永樂 元次, 幹細胞培養における細胞外環境の制御とオルガノイド形成, 第47回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2024年11月27日-29日

三井 優輔、鈴木 美奈子、高田 慎治、永樂 元次、大谷 哲久, in vitro 系での平面細胞極性の再構成, 第47回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2024年11月27日-29日

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して努めています。2024年は、ビブリオ菌の分泌モニタータンパク質 VemP の翻訳停止解除に関わる *cis* 及び *trans* 因子を同定し、また、細菌 S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼの基質との複合体構造を決定するとともにそれを基にした解析により基質取り込み・切断機構を明らかにしました。

1) ビブリオ属細菌の分泌モニター因子 VemP の翻訳停止解除は、複数の *cis* 因子と SecY を含む複数の *trans* 因子によって制御される

VemP はビブリオ属細菌が持つ分泌モニター因子であり、自身の翻訳の停止を介して細胞のタンパク質膜透過能をモニターし、同一オペロン下流に位置する *secD2/F2* 遺伝子（膜透過促進因子をコードしている）の発現制御を担う。細胞のタンパク質膜透過能が正常な際には、VemP の翻訳停止は速やかに解除されるため、*secD2/F2* の発現は抑制された状態にある。先行研究において、1) VemP の翻訳停止の解除は自身の膜透過の後期過程で SecY/E/G 膜透過装置上で起こること、2) その解除には SecD/F, ペリプラズムシャペロン複合体 PpiD/YfgM の両 *trans* 因子を必要とすること、3) VemP の翻訳アレストの適切な解除には、分子内の *cis* 因子 Arg-85 残基が必須の役割を持つこと等を明らかにしてきたが、VemP 翻訳停止解除の詳細な分子機構は未だ明らかではなかった。本研究は、SecY 膜透過チャンネルを通過途上の VemP 新生鎖がどのようにして SecD/F 機能を特異的にモニターしているかを解明することを目指している。まず、遺伝学的・生化学的研究結果から、SecY が VemP の翻訳アレスト解除に関与していること、翻訳停止状態の VemP 新生鎖が SecY 分子内の特定の部位で安定に結合・停止していることを明らかにした。次に、VemP-Bla レポーター系を用いた変異解析結果から、VemP 分子内の Arg-85 残基に近接し 78-81 残基からなる保存された短い疎水性領域 (SHS と略

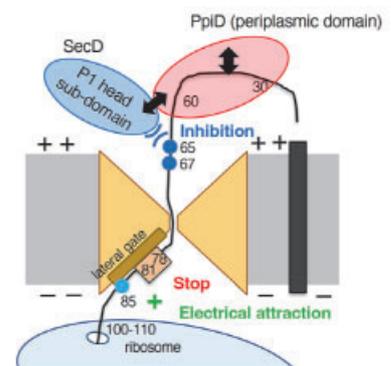


Fig. 1. Working hypothesis of the *cis*-element mediated translation arrest-cancellation of VemP.

す) が、その制御された翻訳停止解除において極めて重要な役割を持ち、その疎水性度と翻訳停止の安定性の間には相関があることを示した。更に、翻訳停止解除の制御に関与する新たな *cis* 因子 Gln-67, Pro-67 残基を同定した。以上の実験結果に基づき、図 1 に示すように「これら複数の *cis*, *trans* 因子は、各々個別の役割を持ち、それらが統合的に働くことで VemP の翻訳停止解除のタイミングを巧妙に調節している。」という新たな作業仮説を提案した。

2) クライオ電顕解析により決定された細菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質結合構造及び基質取り込み・切断機構の解析

膜内切断プロテアーゼは、疎水的環境である細胞膜の脂質二重層内部で膜タンパク質の加水分解反応を行うというユニークな酵素である。この酵素は細菌からヒトまでさまざまな生物種が持っており、重要な生体プロセスの制御に関わっている。本研究では、細菌の持つ金属触媒型の膜内切断プロテアーゼである RseP を対象とした構造解析及び生化学的解析により、基質認識・切断機構の解析を行った。横浜市立大学の禾晃和博士らとの共同研究により、大腸菌中で発現させた超好熱性細菌 *Aquifex aeolicus* の RseP オルソログ (*AaRseP*) のクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行い、その全体構造を決定した。その構造では、膜中のプロテアーゼドメインにおいて、ゲート構造により膜脂質から隔離された空間 (TM-cavity) の内部に直鎖状の分子が結合し、亜鉛触媒部位近傍から膜境界に配置されたヘリックス構造に囲まれた穴のような領域 (PCT-hole と命名) を通り抜けて膜外空間まで達していることが示された。この分子に対し横浜市立大学の明石知子博士らとの共同研究により質量分析による配列解析を行い、大腸菌由来の複数回膜貫通タンパク質の C 末端断片であると同定した。そこでこれらの情報を基に、RseP と基質ポリペプチド主鎖のドッキング構造モデルを構築した。次に、この分子が切断基質を模倣するように RseP に結合している可能性を考え、この分子の断片を含むモデル基質を構築し、大腸菌中で *AaRseP* と共発現させて部位特異的 *in vivo* 光架橋解析を行った。その結果、標的とした RseP の PCT-hole の内部でモデル基質との架橋が検出され、生体中でも基質が TM-cavity 内部に取り込まれたドッキング状態をとりうることを示唆された。以上の結果から我々は、①基質となる膜タンパク質は RseP のゲート構造の構造変換を介して糸通しのよう PCT-hole をくぐり抜け、②脂質膜から隔離された TM-cavity の内部に取り込まれた基質タンパク質がヘッドロックのようにしっかりと固定され、③引き伸ばされた状態で触媒部位に提示されて切断を受ける。という基質取り込み・切断機構モデルを提案した (Asahi *et al.*, 2025, *Sci. Adv.*; 図 2)。RseP は細菌の増殖や感染制御にも深く関与する。基質結合様式や切断機構をさらに詳しく調べていくことで、将来的には、病原菌の感染や増殖を抑えるような感染症治療薬や予防薬の開発につながることを期待される。

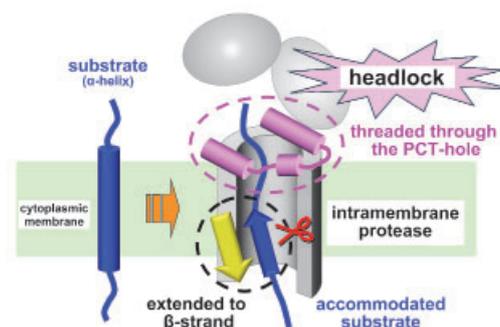


Fig. 2. Substrate accommodation model of RseP.

本年度は、理学研究科修士課程大学院生として平川 柁さんと吉川昂甫さんが新たに研究室に加わり、清水洋祐さんと山田高暉さんが同修士課程を修了して研究室を去りました。又、沢里克宏さんが4月に博士研究員として参加し、翌3月に岩手大学助教として転出しました。

Research in this laboratory focuses on the 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 a combination of molecular genetic, biochemical, biophysical, and structural approaches. In 2024, we identified both *cis*- and *trans*-acting factors involved in the translation arrest cancellation of *Vibrio* secretion monitor VemP. In addition, we elucidated the substrate-bound structure of the bacterial S2P family intramembrane metalloprotease RseP and proposed a structure-based model for its substrate accommodation and cleavage mechanism.

1) Translation arrest cancellation of VemP, a secretion monitor in *Vibrio*, is regulated by multiple *cis*- and *trans*-factors, including SecY

VemP is a secretory protein in the *Vibrio* species that monitors cellular protein-transport activity through its translation arrest, allowing expression of the downstream *secD2-secF2* genes in the same operon, which encode components of the protein translocation machinery. Typically, *secD2/F2* expression remains repressed as VemP translation arrest is canceled immediately. Previous studies reveals that 1) the VemP arrest-cancellation occurs on the SecY/E/G translocon in a late stage in the translocation process, 2) the arrest-cancellation requires both *trans*-factors, SecD/F and PpiD/YfgM, a periplasmic chaperon complex, and 3) a *cis*-element, Arg-85 in VemP play essential roles in the arrest-cancellation. However, the detailed molecular mechanism remains elusive. This study aimed to elucidate how the VemP nascent polypeptide passing through SecY specifically monitors SecD/F function. First, by genetic and biochemical studies, we showed that SecY is involved in the VemP arrest-cancellation and that the arrested VemP is stably associated with a specific site in the protein-conducting pore of SecY. Second, using VemP-Bla reporter analyses, we found that a short hydrophobic segment (SHS) adjacent to Arg-85 plays a critical role in the regulated arrest-cancellation with its hydrophobicity correlating with the stability of the VemP arrest. Finally, we identified Gln-65 and Pro-67 in VemP as novel *cis* elements important for the regulation. Based on these results, we proposed a model for the regulation of the VemP arrest cancellation by multiple *cis*-elements and *trans*-factors with different roles (See Fig. 1).

2) Substrate-bound structure of the bacterial intramembrane protease RseP determined by cryo-electron microscopic analysis and the proposed substrate accommodation and cleavage mechanism

Site-2 proteases (S2Ps), conserved intramembrane metalloproteases that maintain cellular homeostasis, are associated with chronic infection and persistence leading to multi-drug resistance in bacterial pathogens. A

structural model of how S2Ps discriminate and accommodate substrates could help us develop selective antimicrobial agents. We previously proposed that RseP, the *E. coli* S2P protease, unwinds helical substrate segments before cleavage (Imaizumi *et al.*, 2022, *Sci. Adv.*), but the mechanism for accommodating a full-length membrane-spanning substrate remained unclear. Our present cryo-EM analysis of *Aquifex aeolicus* RseP (*AaRseP*) revealed that a substrate-like membrane protein fragment from the expression host occupied the active site while spanning a transmembrane cavity that is inaccessible via lateral diffusion. Furthermore, *in vivo* photo-cross-linking supported that this substrate accommodation mode is recapitulated on the cell membrane. Our results suggest that the substrate accommodation by threading through a conserved membrane-associated region stabilizes the substrate-complex and promotes efficient hydrolysis of the substrates within the membrane (Asahi *et al.*, 2025, *Sci. Adv.*, see Fig. 2).

List of Publications

Asahi, K., Hirose, M., Aruga, R., Shimizu, Y., Tajiri, M., Tanaka, T., Adachi, Y., Tanaka, Y., Kaneko, M.K., Kato, Y., Akashi, S., Akiyama, Y., Hizukuri, Y., Kato, K., and Nogi, T. (2025). Cryo-EM structure of the bacterial intramembrane metalloprotease RseP in the substrate-bound state. **Sci. Adv.** *11*, eadu0925.

Sawasato, K., Dowhan, W., and Bogdanov, M. (2025). Its own architect: Flipping cardiolipin synthase. **Sci. Adv.** *11*, eads0244.

Ikeda, Y., Miyazaki, R., Tsukazaki, T., Akiyama, Y., and Mori, H. (2024). Translation arrest cancellation of VemP, a secretion monitor in *Vibrio*, is regulated by multiple *cis* and *trans* factors, including SecY. **J. Biol. Chem.** *300* (10), 107735.

Watanabe, A., Koyano, F., Imai, K., Hizukuri, Y., Ogiwara, S., Ito, T., Miyamoto, J., Shibuya, C., Kimura, M., Toriumi, K., Motono, C., Arai, M., Tanaka, K., Akiyama, Y., Yamano, K., and Matsuda, N. (2024). The origin of esterase activity of Parkinson's disease causative factor DJ-1 implied by evolutionary trace analysis of its prokaryotic homolog HchA. **J. Biol. Chem.** *300* (7), 107475.

Yokoyama, T., Miyazaki, R., Suzuki, T., Dohmae, N., Nagai, H., Tsukazaki, T., Kubori, T., and Akiyama, Y. (2025). Cleavage cascade of the sigma regulator FecR orchestrates TonB-dependent signal transduction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** *122* (16), e2500366122.

List of Presentation

池田優希、矢久保俊輝、秋山芳展、森博幸 分泌モニター VemP の翻訳停止の解除に関わる新たな *cis* 因子の同定とその作用機序の解明に向けて 第20回21世紀大腸菌研究会、宮崎、2024年6月17-18日

沢里克宏、William Dowhan、Mikhail Bogdanov カルジオリピン生合成酵素 ClsA の活性ドメインの膜上での配向性の変化とその生理的意義 第20回21世紀大腸菌研究会、宮崎、2024年6月

17-18 日

清水洋祐、小林達也、旭 紀久子、有賀理江、禾 晃和、檜作洋平、秋山芳展 光架橋法を用いた膜内切断プロテアーゼ RseP のゲートの構造変化を介した基質ドッキング機構の解析 第 19 回 21 世紀大腸菌研究会、宮崎、2024 年 6 月 17-18 日

宮崎亮次、西 建留、木元麻衣、大門康志、塚崎智也、秋山芳展 外膜品質管理プロテアーゼ BepA α 6-loop 領域の驚くべき構造変化 第 19 回 21 世紀大腸菌研究会、宮崎、2024 年 6 月 17-18 日

檜作洋平 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の構造・機能解析：油の中の加水分解は如何にして起こるのか？ 大阪公立大学 生物学専攻セミナー、大阪、2024 年 9 月 13 日

渡辺藍子、今井賢一郎、檜作洋平、本野千恵、秋山芳展、松田憲之 パーキンソン病の原因因子 DJ-1 の大腸菌ホモログの解析から推察するエステラーゼ活性の起源 第 97 回日本生化学会大会、横浜、2024 年 11 月 6-8 日

清水洋祐、小林達也、旭 紀久子、有賀理江、禾 晃和、檜作洋平、秋山芳展 細菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質ドッキング機構の研究：ゲート構造を標的とした *in vivo* 光架橋解析 第 97 回日本生化学会大会、横浜、2024 年 11 月 6-8 日

檜作洋平 細菌膜内切断プロテアーゼ RseP の生理基質選択性の理解と阻害剤開発に向けた基盤創生、シンポジウム「タンパク質の膜内切断：メカニズムの理解と医療応用に向けた挑戦」第 97 回日本生化学会大会、横浜、2024 年 11 月 6-8 日

旭 紀久子、廣瀬未果、有賀理江、清水洋祐、田尻道子、田中 翼、安達友里子、田中ゆかり、金子美華、加藤幸成、明石知子、秋山芳展、檜作洋平、加藤貴之、禾 晃和 超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来膜内切断プロテアーゼ RseP の基質結合状態のクライオ電子顕微鏡構造 2024 年度日本結晶学会年会、名古屋、2024 年 11 月 8-10 日

横山達彦、宮崎亮次、鈴木健裕、堂前直、久堀智子、永井宏樹、塚崎智也、秋山芳展 グラム陰性細菌が外界の鉄を感知する分子メカニズム 第 61 回日本細菌学会中部支部総会、金沢、2024 年 11 月 22-23 日

宮崎亮次、西 建留、木元麻衣、大門康志、塚崎智也、秋山芳展 細菌外膜品質管理プロテアーゼ BepA の可動性ループ領域の機能解析 第 47 回日本分子生物学会大会、福岡、2024 年 11 月 26-29 日

檜作洋平 細菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質結合構造モデルから提案する Threading(糸通し)機構 2024 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞生物における細胞装置の多様性と調和」、三島、2025 年 3 月 24-25 日

沢里克宏 大腸菌の細胞質膜を横断したリン脂質の輸送経路の同定の試み 2024 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞生物における細胞装置の多様性と調和」、三島、2025 年 3 月 24-25 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 Vandenberg
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の観点から解析している。Vandenberg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) $\alpha 1$ -アンチトリプシン C 末端ペプチドによる GPCR 非依存的な三量体 G タンパク質 G13 活性化機構 (豊島グループ)

抗炎症タンパク質である $\alpha 1$ -アンチトリプシン (AAT) は、SERPINA ファミリーに属するプロテアーゼ阻害因子である。AAT は、エラスターゼや MMP 等によりカルボキシル末端が切断され、数十アミノ酸からなる AAT-C 末端ペプチドが産生される。我々は以前、マウス由来の AAT-C 末端ペプチド (以下 mAAT-C1-35) がヘテロ三量体 G タンパク質の G13 を介してタイトジャンクションを強化することを報告した。本研究では、以下 mAAT-C1-35 による G13 の制御機構を解析した。まず、mAAT-C1-35 は N 末端領域 (mAAT-C1-17) を介して GDP 結合型 G13 に直接結合し、GTP 非存在下で G13・GDP とそのエフェクタータンパク質 (p115-RhoGEF) との相互作用を促進することを明らかにした。次に、一連の欠失型とアラニンスキャン解析により、AAT-C 末端ペプチドの最小機能領域と必須アミノ酸残基を特定した。さらに、G13・GDP と mAAT-C1-17 の複合体の分子動力学 (MD) シミュレーションにより、mAAT-C1-17 による G13 の活性型コンフォメーションの構造誘導機構を示した (図1) (Park, et al., J. Biol. Chem, 2025)。本研究により、AAT-C 末端ペプチドが GPCR 非依存的に G13 を活性化することが明らかとなり、AAT が関与する疾患の機序解明に繋がると期待される。

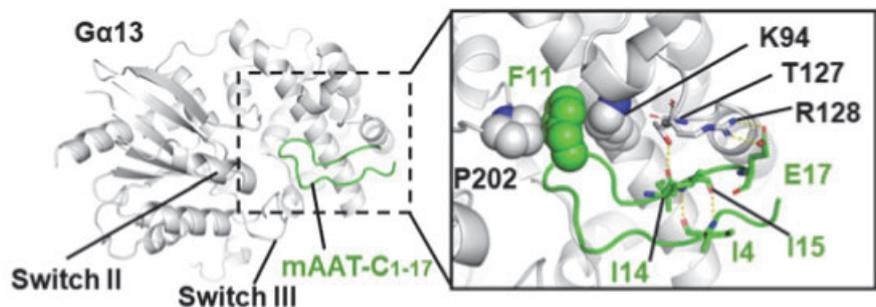


Fig.1 Docking model of mAAAT-C1-17 and G α 13・GDP complex (collaboration with Dr. Matsumoto and Dr. Okuno at Dept. Medicine, Kyoto University).

2) 空間トランスクリプトミクスおよび単一細胞データのバイオインフォマティクス解析 (Vandenbon グループ)

組織内の細胞の空間的な配置が細胞機能、遺伝子発現パターン、疾患状態とどのように関連しているかを理解するために、空間トランスクリプトミクスのデータベース DeepSpaceDB (www.DeepSpaceDB.com) を構築した (Honcharuk et al., bioRxiv, 2025; Vandenbon and Takemoto, 実験医学, 2025)。この DeepSpaceDB には 2025 年 3 月時点で、10X Genomics Visium プラットフォームの 1,674 のサンプルが含まれており、多様な条件下でのヒトおよびマウスの組織がカバーされている (図 2A)。ユーザーはデータベース上のさまざまな探索ツールを使ってサンプル内の関心領域をインタラクティブに選択し、複数の関心領域の遺伝子発現パターンを比較することができる (図 2B-D)。現在、10X Genomics Xenium プラットフォームのサンプル収集も進めており、単一細胞レベルの遺伝子発現と空間的組織構築の関係性を DeepSpaceDB によってより統合的に解析することを目指している。

空間および単一細胞トランスクリプトミクスデータにおける細胞型予測の精度を向上させるためのバイオインフォマティクス手法を開発した。マウス肝臓の空間トランスクリプトミクス 30 サンプルを解析し、癌や食事などの条件が肝臓ゾネーションと遺伝子発現にどのような影響を与えるかを明らかにした。また、転移した乳ガン細胞が段階的に CD169+ マクロファージをリンパ節から除去し、抗ガン免疫の重要なステップを無効化することを、空間トランスクリプトミクスデータを用いた細胞型の空間パターン解析によって明らかにした (Maeshima et al., EBioMedicine, 2024)。

ハウスキーピング遺伝子およびジンクフィンガー遺伝子のコアプロモーター間における染色体相互作用の解析や、SARS-CoV-2 感染に対するマウスの好中球集団の変化の解析に貢献した。

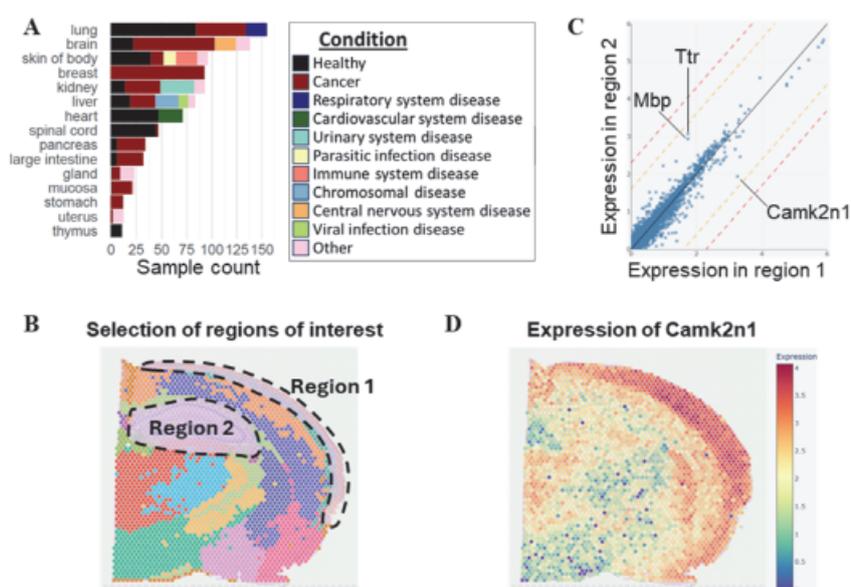


Fig. 2. (A) The number of human samples in DeepSpaceDB for a selection of tissues and organs. Colors represent different conditions. (B-D) Illustration of a tool in DeepSpaceDB. Users can manually select regions of interest, such as different regions in the mouse brain (B) and inspect the gene expression patterns in the selected regions (C). We can confirm that gene *Camk2n1* has a high expression in region 1 compared to region 2.

1) GPCR-independent activation mechanism of trimeric G protein G α 13 by α 1-antitrypsin C-terminal peptide.

α 1-antitrypsin (AAT), the SERPINA family of protease inhibitor, is an anti-inflammatory protein whose blood levels increase during inflammation. The carboxyl terminus of AAT is cleaved by various proteases which results in producing AAT-C-terminal peptides of 20-40 amino acids length. We previously reported that AAT-C-terminal peptides (hereafter mAAT-C1-35) from mouse act to enhance tight junctions via G α 13 of heterotrimeric G proteins. In this study, we analyzed the regulatory mechanism of G α 13 by mAAT-C1-35. First, mAAT-C1-35 binds directly to GDP-bound G α 13 via its N-terminal region (mAAT-C1-17) and promote the interaction between G α 13/GDP and its effector protein (p115-RhoGEF). A series of deletion-type and alanine-scanning analyses identified the minimal functional region and essential amino acid residues of mAAT-C1-17. Molecular dynamics (MD) simulations of the complex structure of G α 13/GDP and mAAT-C1-17 showed that the binding of mAAT-C1-17 near the switch region of G α 13 stabilizes the switch II and III regions and maintains the active conformation of G α 13 (Fig. 1) (Park, et al., J. Biol. Chem, 2025). The present study reveals that AAT-C-terminal peptides activate G-protein signaling in a G-protein-coupled receptor-independent manner, which is expected to help elucidate the mechanisms of AAT-mediated diseases.

2) Bioinformatics analysis of spatial and single-cell data (Vandenbon Group)

Spatial transcriptomics technology allows researchers to study the spatial organization of cells within tissues. However, this technology is expensive, and the resulting data is complex. To make spatial transcriptomics data more accessible to researchers, we have constructed DeepSpaceDB (www.DeepSpaceDB.com), a database for spatial transcriptomics samples (Honcharuk et al., bioRxiv, 2025; Vandenbon and Takemoto, 実験医学, 2025). As of March 2025, DeepSpaceDB includes 1,674 samples of the 10X Genomics Visium platform, covering a wide variety of human and mouse tissues under various conditions (Figure 1A). The database also includes a variety of tools for exploring samples. As an example, one tool allows users to interactively select regions of interest within a sample with the mouse cursor and compare the gene expression patterns within the selected regions (Figure 1B-D). We are also collecting samples of the 10X Genomics Xenium platform.

In other projects related to spatial transcriptomics, Hongyi Zhao (赵弘毅; M2) is analyzing how liver zonation is affected by conditions such as cancer. Afeefa Zainab is constructing a bioinformatics approach for improving cell type predictions. We also contributed to the analysis of CD169+ macrophages in metastatic lymph nodes of breast cancer patients (Maeshima et al., EBioMedicine, 2024).

List of Publications

Park Y, Matsumoto S, Ogata K, Ma B, Kanada R, Isaka Y, Arichi N, Liang X, Maki R, Kozasa T, Okuno Y, Ohno H, Ishihama Y, Toyoshima F. (2025). Receptor-independent regulation of G α 13 by alpha-1-antitrypsin C-terminal peptides. J Biol Chem. 301, 108136.

Maeshima Y., Kataoka T.R., Vandebon A., Hirata M., Takeuchi Y., Suzuki Y., Fukui Y., Kawashima M., Takada M., Ibi Y., Haga H., Morita S., Toi M., Kawaoka S. and Kawaguchi K. (2024). Selective elimination of CD169+ macrophages in lymph nodes invaded by breast cancers. **EBioMedicine**, 107,105271.

Honcharuk V., Zainab A., Horimoto Y., Takemoto K., Diez D., Kawaoka S., and Vandebon A. (2025). DeepSpaceDB: a spatial transcriptomics atlas for interactive in-depth analysis of tissues and tissue microenvironments. **bioRxiv**, doi:10.1101/2025.01.05.631419.

一條遼 (2025). 皮膚の硬さと組織幹細胞の恒常性の破綻 皮膚科 科学評論社 7, 91-96.

豊島文子 (2025) 妊娠における母体臓器のリモデリング 実験医学 43, 516-520.

Vandebon A. and Takemoto K. (2025). DeepSpaceDB：空間トランスクリプトミクスデータの探索的解析. 実験医学, 43, 6.

List of Presentations

豊島文子 組織リモデリングにおける空間トランスクリプトームと組織剛性 日本骨代謝学会学術集会、那覇、2024年7月2日

豊島文子 母体臓器リモデリングと胎仔発生 日本細胞生物学会大会、筑波、2024年7月19日

一條遼 細胞間コミュニケーションに着目した皮膚恒常性メカニズム 日本分子生物学会年会、福岡、2024年11月27日

豊島文子 血管が駆動する皮膚リモデリング機構 CVMW2024、東京、2024年12月8日

Ichijo, R. Understanding skin homeostasis from a unique perspective. 理研若手セミナー, Yokohama, March 4, 2025.

豊島文子、遺伝子発現と力場の空間情報から解明する生理的臓器リモデリング機構 APPW2025、東京、2025年3月18日

Vandebon, A. DeepSpaceDB: a spatial transcriptomics atlas that allows interactive in-depth analysis of tissues and tissue microenvironments. NGS EXPO 2024, Osaka, September 4, 2024.

Vandebon A. SingleCellHaystack: A universal differential expression prediction tool for single-cell and spatial genomics data. Bio"Pack"athon 2024, Osaka, September 20, 2024.

Vandebon A. DeepSpaceDB: a spatial transcriptomics atlas for interactive in-depth analysis of tissues and tissue microenvironments. APJBC2024, Okinawa, October 23, 2024.

Vandebon A. DeepSpaceDB: an Interactive Database for Spatial Transcriptomics Data. 30th East Asia Joint Symposium, Taiwan, October 29, 2024.

数理生物学分野
Laboratory of Mathematical Biology

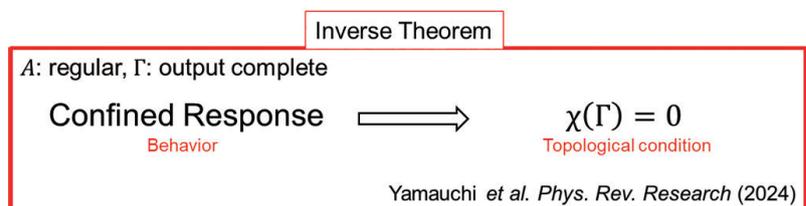
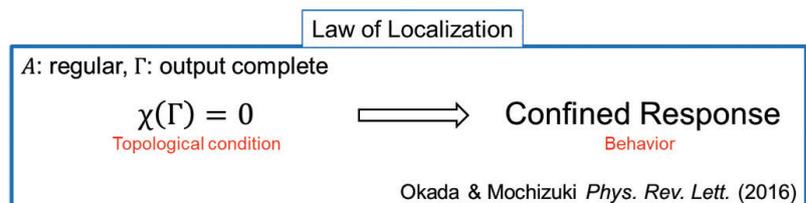
教授	望月 敦史	Prof.	Atsushi Mochizuki
准教授	岡田 崇	Assoc. Prof.	Takashi Okada
助教	石川 雅人	Assist. Prof.	Masato Ishikawa
特定助教	山内 悠平	Assist. Prof.	Yuhei Yamauchi

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) 化学反応系における限局側の逆定理の証明

化学反応系において、ネットワークの部分構造があるトポロジカルな条件を満たすだけで、制御モジュールとしての機能が生じることを、これまでに理論的に示してきた。化学反応系の部分構造 Γ が条件式： $\chi(\Gamma) := (\text{分子の数}) - (\text{反応の数}) + (\text{サイクルの数}) - (\text{保存量の数}) = 0$ を満たすとき、この構造は「緩衝構造」となり、構造内部の（酵素活性などの）パラメータの変化は、定常状態では構造内部の分子濃度や反応速度にのみ影響を与え、外部の分子や反応には影響しないことを、数学的に証明した。この定理は「限局則」と呼ばれ、化学反応系の振る舞いを支配する基本法則として注目を集めている。実際の細胞内の反応ネットワークにおいても、緩衝構造は複数存在し、機能調節の単位として働いていると考えられる。例えば、細胞周期の異なるチェックポイントが緩衝構造によって独立に制御されることを我々は予測し、現在定量実験によって検証しつつある。

今回我々はこの定理の逆が成立することを数学的に示した。すなわち、パラメータの変化の影響が反応ネットワークの一部に限局するならば、必ず対応する緩衝



Direct connection between Topology and Behavior.

Fig. 1. Logical relationship between “law of localization” and inverse theorem.

構造が存在する。言い換えるならば、酵素などのパラメータの変化に対して、変化しない分子が1つでも存在するシステムには、必ず緩衝構造が存在する。この定理により、ネットワークの構造と、システムの振る舞いとの関係を、一対一で結びつけられた。またこの定理により、パラメータ変化に対する振る舞いの観測のみから、ネットワークの構造を予測する（候補を絞り込む）ことが原理的に可能である。この研究は、Physical Review Research 誌に掲載された。

2) ベイジアン SSA の開発

化学バイオ生産は、脱炭素化社会における主要な技術として注目されている。化学バイオ生産の計算機設計において、酵素反応のアップレギュレーション/ダウンレギュレーションに伴う代謝流の変化、すなわち酵素擾乱に対するシステムの応答を予測することは不可欠である。これまでに我々は、反応ネットワークの構造情報をのみから酵素擾乱に対する定性的応答を予測する手法、構造成度解析 (SSA) を開発してきた。しかし、反応ネットワークの構造のみからでは、定性的な応答を完全に予測するには不十分な場合があり、これはバイオ生産応用における実際的な課題であった。この課題を解決するため、我々は SSA を基盤としたベイジアン統計モデルである BayesianSSA を開発した。BayesianSSA は、関心のある環境で収集された擾乱データから環境情報を抽出し、SSA 予測に定量的に統合する。

Escherichia coli の中央代謝経路の合成データと実データにベイジアン SSA を適用した結果、擾乱データから抽出された環境情報を予測に成功裏に統合できることが分かった。さらに、ベイジアン SSA で推定された事後分布は、以前の研究でコハク酸の輸出流量を増加させるとして報告された既知の経路と関連付けられることが確認された。ベイジアン SSA が化学バイオ生産プロセスを加速し、この分野の進展に貢献すると考えている。

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) Inverse theorem for the Law of Localization

We have previously shown theoretically that in chemical reaction systems, a substructure of a network can function as a regulatory module simply by satisfying certain topological conditions. When a substructure Γ of a chemical reaction system satisfies the condition formula: $\chi(\Gamma) := (\text{number of molecules}) - (\text{number of reactions}) + (\text{number of cycles}) - (\text{number of conserved quantities}) = 0$, it becomes a “buffering structure”, and it has been mathematically proven that changes in parameters (such as enzyme activity) within the

structure only affect the molecular concentration and reaction rate within the structure in the steady state, and do not affect external molecules or reactions. This theorem is called the “law of localization” and is attracting a great attention as a fundamental law governing the behavior of chemical reaction systems. In actual intracellular reaction networks, there may be multiple buffering structures that act as units of functional regulation.

In this study, we have mathematically shown that the inverse of this theorem is true. In other words, if the effects of parameter changes are localized to a part of the reaction network, then there always exists a corresponding buffering structure. This theorem establishes a one-to-one relationship between the structure of the network and its behavior. In addition, this theorem makes it possible in principle to predict (reduce the number of candidates for) the structure of a network based solely on observations of its behavior in response to parameter changes. This research was published in Physical Review Research.

2) Inverse theorem for the Law of Localization

Chemical bioproduction has attracted attention as a key technology in a decarbonized society. In computational design for chemical bioproduction, it is necessary to predict changes in metabolic fluxes when up-/down-regulating enzymatic reactions, that is, responses of the system to enzyme perturbations. We have previously developed Structural sensitivity analysis (SSA), by which we can predict qualitative responses to enzyme perturbations based on the structural information of the reaction network alone. However, there are some cases, where qualitative responses cannot be uniquely determined only from information of network structure. That has been a practical issue in bioproduction applications. To address this, in this study, we developed BayesianSSA, a Bayesian statistical model based on SSA. BayesianSSA extracts environmental information from perturbation datasets collected in environments of interest and integrates it into SSA predictions.

We applied BayesianSSA to synthetic and real datasets of the central metabolic pathway of *Escherichia coli*. Our result demonstrates that BayesianSSA can successfully integrate environmental information extracted from perturbation data into SSA predictions. In addition, the posterior distribution estimated by BayesianSSA can be associated with the known pathway reported to enhance succinate export flux in previous studies. We believe that BayesianSSA will accelerate the chemical bioproduction process and contribute to advancements in the field.

3) Mathematical studies for biological phenomena

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

List of Publications

Yamauchi Y., Hishida A., Okada T., Mochizuki A., (2024) Finding regulatory modules of chemical reaction

systems. *Phys. Rev. Research* **6**, 023150.

Ooka H., Wintzer M E., Komatsu H., Suda T., Adachi K., Li A., Kong S., Hashizume D., Mochizuki A., Nakamura R., (2024) Microkinetic Model to Rationalize the Lifetime of Electrocatalysis: Trade-off between Activity and Stability. *Journal of Physical Chemistry Letters* **15** (40), 10079–10085.

Okino R., Mukai K., Oguri S., Masuda M., Watanabe S., Yoneyama Y., Nagaosa S., Miyamoto T., Mochizuki A., Takahashi S. & Hakuno F., (2024) IGF-I concentration determines cell fate by converting signaling dynamics as a bifurcation parameter in L6 myoblasts. *Scientific Reports* **14**, 20699.

Hosoda S., Iwata H., Miura T., Tanabe M., Okada T., Mochizuki A. & Sato M., (2024) BayesianSSA: a Bayesian statistical model based on structural sensitivity analysis for predicting responses to enzyme perturbations in metabolic networks. *BMC Bioinformatics* **25**, 297.

Yu Q., Ascensao J., Okada T., COVID-19 Genomics UK (COG-UK) consortium, Boyd O., Volz E. & Hallatschek O., (2024) Lineage frequency time series reveal elevated levels of genetic drift in SARS-CoV-2 transmission in England, *PLOS Pathogens*, **20** (4), p.e1012090.

Ishizawa H., Tashiro Y., Okada T., Inoue D., Ike M. & Futamata H., (2024) Uncovering the causal relationships in plant-microbe ecosystems: A time series analysis of the duckweed cultivation system for biomass production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 957, p.177717.

List of Presentations

Mochizuki, A. “*Biological functions and functional modules originated in structure of chemical reaction network.*” (Plenary Lecture), KSMB-SMB Joint meeting 2024, Konkuk University, Seoul, Republic of Korea, June 30 -July 5, 2024

Mochizuki, A. “*Controlling cell fate specification system based on network structure.*” (Invited), 30th East Asia Biomedical Research Joint Symposium, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, October 29 -November 1, 2024

Okada T., “*Sensitivities and network topology in biochemical reaction systems*”, Physics 2024, Boston, USA, October 21, 2024

望月敦史. 招待講演「生命システムの振る舞いをネットワークの形だけから決定する」. 第56回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 神戸国際会議場, 2024年7月6日-7日

望月敦史. 招待講演「ネットワーク構造に由来する生命機能と機能単位」. 第97回日本生化学会大会, パシフィコ横浜ノース, 2024年11月6日-8日

岡田崇, Huang YJ, 望月敦史, “*Deciphering the Dynamics and Functions of Metabolic Networks from Their Network Structure.*”, 第47回分子生物学会, 2024年11月29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

当分野では、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開発、特に一細胞解析技術との融合も重要な研究テーマとしている。

本年度は、You Yujin さんが医学研究科医科学専攻修士課程に入学し、研究を開始した。また、板谷勇輝さんが研究生として当分野に加わった。

本年度は、当研究室で開発した CRISPR スクリーニング法を使い、製薬ベンチャーとの共同研究で進めてきた新規がん治療標的 CDK12 の阻害剤の開発、また、CDK12 阻害感受性に関する因子の同定、またその解析を進め、研究がまとまった。

CDK12 とその近縁の CDK13 は転写制御に関与する CDK で、RNA ポリメラーゼ II の C 末端ドメイン (CTD) にある 7 アミノ酸繰り返し配列中の 2 番目のセリン (S2) をリン酸化する。CTD のリン酸化は、CDK7 が 5 番目のセリンをリン酸化することで RNA ポリメラーゼ II がプロモーターで転写開始準備状態に、CDK9 が S2 をリン酸化することで転写伸長が起こる。CDK12/13 によって CTD の S2 がさらに導入されることで、転写伸長が維持される。よって、特に長い遺伝子の転写に CDK12/13 による S2 リン酸化は重要で、CDK12/13 を阻害するとこのような遺伝子の転写量が低下する。DNA 修復に関わる遺伝子 (例えば *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *WRN*, *BLM*) は遺伝子長が長く、CDK12/13 阻害により顕著な発現低下が認められ、DNA 損傷の修復が破綻する。このため PARP1 阻害剤との合成致死の誘導が可能であり、現在治療薬として認可されている PARP1 阻害剤耐性の克服法としても注目されている。

我々は難治性乳がん卵巣がんを治療標的に定め、CDK12/13 阻害剤の開発を進め、セルフリーアッセイと細胞レベルでの CDK12/13 キナーゼ活性の阻害及び細胞増殖阻害活性、また、動物モデルで高い抗腫瘍効果を示す低分子化合物を創成することに成功した。これまでに幾つかの CDK12/13 阻害剤の開発が行われているが、治療対象患者の選定に使える明確なバイオマーカーの報告はない。乳がんや卵巣がんにおいては、HER2 に近接する CDK12 が co-amplify する症例が見られ CDK12 が

過剰発現する。このような症例に関しては CDK12 の阻害が一定程度効果を示すとする報告もあるが、我々の CDK12/13 阻害剤を使ったがん細胞パネル試験では明確な相関は見られなかった。このような背景から CRISPR スクリーニングにより網羅的に CDK12/13 阻害剤感受性に関わる因子を探索し、薬剤耐性や感受性亢進メカニズムの解析、またバイオマーカーとしての応用を目指すこととした。

まず、CRISPR-activation スクリーニングを行い、発現上昇により CDK12/13 阻害剤感受性へ影響を及ぼす因子を同定した。細胞株としてトリプルネガティブ乳がん細胞株を用いた。結果、抗アポトーシス因子の発現上昇により感受性が低下するとの結果が得られた。この結果は、抗アポトーシス因子の抑制が CDK12/13 阻害剤の感受性を亢進させることを意味するため、抗アポトーシス因子に対する阻害剤と CDK12/13 阻害剤の二重投与による抗増殖活性を検証した。CDK12/13 阻害剤単独では、ある濃度設定でアポトーシスによる細胞死亢進は 24 時間以上の処理が必要で、48 時間以降で特に高いアポトーシスが観察された。この濃度条件に、抗アポトーシス因子に対する阻害剤を添加すると処理開始 4 時間でアポトーシスが誘導され、8 時間までにほぼ全ての細胞が死滅した。この非常に早いアポトーシスの誘導は *BAK/BAX* の二重変異で阻止されたことから、ミトコンドリア経路でのアポトーシスの亢進が示された。CDK12/13 阻害剤処理後の主要な BCL2 ファミリータンパク質の発現を解析した結果、スクリーニングで同定した以外の抗アポトーシス因子の発現低下が検出され、薬剤二重処理により全ての抗アポトーシス経路の遮断が引き起こされて急速なアポトーシスの誘導が起こっていることが明らかとなった。

CDK12/13 阻害は転写への影響が顕著であり、直接アポトーシス関連タンパク質の翻訳後制御に関与するとは考えにくい。そこで、RNA-seq により CDK12/13 阻害が及ぼす転写への影響を解析した。既報通り我々の CDK12/13 阻害剤でも長い遺伝子では顕著な発現抑制が起きており、ポリ A 付加サイトの上流側への移動による転写産物の短鎖化も確認された。一方、短い遺伝子ではむしろ転写が亢進している傾向が見られ、S2 リン酸化の抑制による転写終結とポリ A 付加の効率低下が見られた。これに伴い、抗アポトーシス遺伝子の転写産物の転写後プロセッシングが影響を受け、核内では転写量は亢進するものの、成熟転写産物の生成が抑制され、細胞質においては mRNA 量が低下していた。

以上から、抗アポトーシス因子阻害剤と CDK12 阻害剤の併用は、CDK12/13 阻害の治療効果をさらに高める治療法となることが示唆された。毒性が気になるころではあるが、マウス担がんモデルにおいては任用量において抗腫瘍効果を確認することができた。更なる開発が期待できる結果を得ることができた。

This year, our laboratory successfully concluded a collaborative research project with a pharmaceutical start-up, focusing on the development of a novel anti-cancer therapeutic target, CDK12. Utilizing a CRISPR screening method developed in-house, we advanced the development of a CDK12 inhibitor, identified factors related to CDK12 inhibitor sensitivity, and analyzed their mechanisms.

CDK12 and its close homolog, CDK13, are cyclin-dependent kinases (CDKs) involved in transcriptional

regulation. They phosphorylate the second serine (S2) within the heptapeptide repeat sequence of the C-terminal domain (CTD) of RNA Polymerase II. Phosphorylation of the CTD initiates and maintains transcription: CDK7 phosphorylates the fifth serine (S5) to prepare RNA polymerase II for transcription initiation at the promoter, and CDK9 phosphorylates S2 to enable transcriptional elongation. The S2 phosphorylation by CDK12/13 further promotes and sustains this elongation. Consequently, S2 phosphorylation by CDK12/13 is particularly crucial for the transcription of long genes. Inhibition of CDK12/13 leads to a significant decrease in the transcription of such genes. Genes involved in DNA repair, such as *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *WRN*, and *BLM*, are typically long. Their expression is markedly reduced upon CDK12/13 inhibition, leading to a failure in DNA damage repair. This makes it possible to induce synthetic lethality with PARP1 inhibitors, a strategy that is gaining attention as a way to overcome resistance to currently approved PARP1 inhibitors.

We focused on treating intractable breast and ovarian cancers and successfully created a small molecule compound with high anti-tumor efficacy in animal models. This compound demonstrated potent inhibitory activity against CDK12/13 kinase in both cell-free assays and cellular contexts, along with significant cell growth inhibition. While several CDK12/13 inhibitors have been developed previously, no clear biomarkers for patient selection have been reported. Some studies have noted that CDK12 is co-amplified with HER2 in certain cases of breast and ovarian cancer, and that inhibiting CDK12 may be effective in these patients. However, our comprehensive cancer cell panel screening using our CDK12/13 inhibitor showed no clear correlation. Based on this, we decided to use CRISPR screening to comprehensively explore factors affecting CDK12/13 inhibitor sensitivity, aiming to analyze the mechanisms of drug resistance and enhanced sensitivity, and to identify potential biomarkers.

Initially, we performed a CRISPR-activation (CRISPR-a) screen to identify factors that, upon upregulation, influence sensitivity to the CDK12/13 inhibitor. We used a triple-negative breast cancer cell line for this screen. The results indicated that the upregulation of anti-apoptotic factors reduces sensitivity. This finding suggested that inhibiting anti-apoptotic factors could enhance the sensitivity to CDK12/13 inhibitors. To test this hypothesis, we examined the anti-proliferative effects of a dual-agent treatment combining our CDK12/13 inhibitor with an inhibitor of anti-apoptotic factors.

With the CDK12/13 inhibitor alone, a specific concentration required more than 24 hours of treatment to induce significant apoptotic cell death, with especially high levels observed after 48 hours. However, when an anti-apoptotic factor inhibitor was added at this concentration, apoptosis was induced as early as 4 hours after treatment, leading to the death of nearly all cells by 8 hours. This rapid induction of apoptosis was prevented by a double mutation in *BAK/BAX*, indicating that the enhanced apoptosis occurs through the mitochondrial pathway. Analysis of major BCL2 family protein expression after CDK12/13 inhibitor treatment revealed a decrease in the expression of anti-apoptotic factors other than those identified in our initial screen. This suggests that the dual treatment simultaneously blocks all anti-apoptotic pathways, leading to the rapid induction of apoptosis.

Given that CDK12/13 inhibition primarily affects transcription, it is unlikely to directly influence the post-

translational regulation of apoptosis-related proteins. Therefore, we used RNA-seq to analyze the transcriptional impact of CDK12/13 inhibition. As previously reported, our CDK12/13 inhibitor caused a notable reduction in the expression of long genes. We also observed a shift of polyadenylation sites to upstream regions, resulting in truncated transcripts. Conversely, transcription of shorter genes tended to be upregulated. This phenomenon appears to be linked to a decrease in the efficiency of transcriptional termination and polyadenylation due to the suppression of S2 phosphorylation.

Consequently, the post-transcriptional processing of anti-apoptotic gene transcripts was affected. Although their transcription was upregulated in the nucleus, the production of mature transcripts was suppressed, leading to a decrease in mRNA levels in the cytoplasm.

In summary, the combined use of an anti-apoptotic factor inhibitor with a CDK12 inhibitor is a promising therapeutic strategy for enhancing the anti-tumor effects of CDK12/13 inhibition. Although potential toxicity is a concern, we successfully confirmed the anti-tumor effect at a well-tolerated dose in a mouse xenograft model. These results warrant further development of this promising therapeutic approach.

List of Publications

<原著論文>

Sakai M, Masuda Y, **Tarumoto Y**, Aihara N, Tsunoda Y, Iwata M, Kamiya Y, Komorizono R, Noda T, **Yusa K**, Tomonaga K, Makino A. (2024)

Genome-scale CRISPR-Cas9 screen identifies host factors as potential therapeutic targets for SARS-CoV-2 infection. **iScience** 27 (8):110475

Nakajima R, Zhou Y, Shirasawa M, Nishimura N, Zhao L, Fikriyanti M, Kamiya Y, Iwanaga R, Bradford AP, Shinmyozu K, **Nishibuchi G**, Nakayama JI, Kurayoshi K, Araki K, Ohtani K. (2024)

DEAD/H Box 5 (DDX5) Augments E2F1-Induced Cell Death Independent of the Tumor Suppressor p53. Int **J Mol Sci**. 25 (24):13251.

<日本語総説等>

樽本雄介、遊佐宏介 (2024) オルガノイド生命医科学研究を飛躍させるテクノロジー 4. CRISPR を用いた機能ゲノミクス解析 実験医学 42 (5), 770-775

青木一成、遊佐宏介 (2024) CRISPR スクリーニング. がんゲノムペディア. 200-202.

遊佐宏介 (2025) CRISPR スクリーニング法を用いたがん治療の新規標的探索 医学のあゆみ 292 (5), 374-378

List of presentations

<招待講演>

- 青木一成 cBAF 複合体は T 細胞性急性リンパ性白血病のがん転写プログラムを制御する 第 19 回血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾) 東京 2024 年 6 月 29 日
- 遊佐宏介 CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用 群馬大学生体調節研究所 群馬 2024 年 8 月 2 日
- 青木一成 古典的 BAF 複合体は T 細胞性急性リンパ性白血病のがん転写プログラムを制御する Advanced Hepatology Seminar 2024 オンライン 2024 年 8 月 31 日
- 遊佐宏介 CRISPR-KO スクリーニングの開発とその応用 第 47 回日本分子生物学会年会 福岡 2024 年 11 月 28 日
- 遊佐宏介 Development and Applications of CRISPR-KO Screening 第 462 回 CBI 学会研究講演会 オンライン 2025 年 2 月 7 日
- 青木一成 血液がんにおける SWI/SNF 複合体の機能 Hematology Expert Conference 京都 2025 年 2 月 20 日
- 遊佐宏介 Development and Applications of CRISPR-KO Screening 第 34 回泌尿器分子・細胞研究会 大阪 2025 年 3 月 1 日

<一般演題>

- 平野友章, 杉野成一, 樽本雄介, 遊佐宏介 CRISPR スクリーニングによるヒト iPS 細胞の胚性内胚葉分化制御遺伝子の同定 第 9 回日本ゲノム編集学会大会 2024 年 6 月 17~19 日
- 樽本雄介, 杉野成一, 山内悠平, 石川雅人, 和穎文, 永樂元次, 望月敦史, 遊佐宏介 遺伝子制御ネットワークの動態の操作による細胞の運命制御 第 9 回日本ゲノム編集学会大会 2024 年 6 月 17~19 日
- 石川雅人, 杉野成一, 増田芳恵, 樽本雄介, 瀬戸裕介, 谷山暢子, 和穎文, 山内悠平, 小嶋泰弘, 木立尚孝, 遊佐宏介, 永樂元次, 望月敦史 摂動後の発現ダイナミクスに基づく遺伝子制御ネットワーク推定 2024 年度日本数理生物学会年会 北海道 2024 年 9 月 11~13 日
- 樽本雄介, 杉野成一, 山内悠平, 石川雅人, 瀬戸裕介, 和穎文, 永樂元次, 望月敦史, 遊佐宏介 遺伝子制御ネットワークの動態の操作による細胞運命の制御 第 47 回日本分子生物学会年会 福岡 2024 年 11 月 27~29 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、健全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。2024年は新たに薬学部薬学科から4回生1名を受け入れ教育指導を行った。また沖川助教が2024年12月をもって退職した。

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。伊藤研究室では長期的に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と白血病幹細胞の維持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。これまでに生きた白血病細胞中で、

BCAT1 依存的に BCKA から BCAA に変換する過程をリアルタイムに検出する技術を確立しているが、この技術を用いて固形腫瘍の細胞においても 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。また、ヒト慢性骨髄性白血病の治療に用いられる薬剤 (TKI) に対して高度耐性を示す患者のなかに分岐鎖アミノ酸代謝の異常を示す群が存在することを発見した。現在、新たな骨髄性白血病動物モデルを利用して 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ことが明らかになった。Msi2 の標的 RNA が明らかになりつつある一方で、Msi2 の幹細胞維持活性がどのように調節されているかは不明なままである。私たちは、Msi2 タンパク質が特徴的な翻訳後修飾を受けることを示す知見を得た。この修飾が Msi2 を不活性化する制御機構として働くことで、不活性化型 Msi2 を多く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、修飾酵素の単離を進めている。また、この修飾を可視化するためのバイオプローブの作製に取り掛かっている。今後は、この修飾酵素の同定とその機能解析から、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、生命科学研究所（現山口大学）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。このバイオセンサーとマウス腫瘍形成モデルを用いた解析で、in vivo 腫瘍組織中での BCAA レベルの可視化と機能解析に取り組んでいる。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、白血病マウスにおける骨髄の神経支配の動態を組織学的に解析した。また新たに導入したマウスシステムを用いて、脳の神経活動をモニタリングすることに取り組んでいる。今後、組織透明化技術も併せて用いることにより、これらの動態を、空間情報を保ったまま可視化できると期待する。

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 leading to 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 completed the investigation of conditions for the isolation of the Msi2 modification enzyme from cell extracts, and are in the process of isolating the modification enzyme. In addition, we have begun to prepare bioprobes to visualize this modification. Based on these findings, we will identify the modification enzyme and analyze its function to reveal the Msi2 activation pathway. In addition to Msi2, we have also identified several RNA-binding proteins that contribute to leukemia stem cell maintenance. We are also working to elucidate the molecular mechanisms of stem cell maintenance for these factors.

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. With the BCAA biosensor, we work on the detection and analysis of BCAA in *in vivo* tumor tissue samples. 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 bone marrow microenvironment produced by the brain-bone marrow networks. This year, the dynamics of bone marrow innervation in leukemic mice were histologically analyzed. We are also working on monitoring neural activity in the brain using a newly introduced mouse strain. Additionally, we plan to use tissue clearing to understand these dynamics while preserving spatial information.

List of Publications

Hildebrandt ER, Hussain SA, Sieburg MA, Ravishankar R, Nadeem A, Gore S, **Ito T**, Houglund JL, Dore TM, Schmidt WK. Targeted Genetic and Small Molecule Disruption of N-Ras Caax Cleavage Alters its Localization and Oncogenic Potential. *Bioorg Chem* (2024).

Wang R, Kato F, Yasui-Watson R, Beedle AM, Call JA, Tsunoda Y, Noda T, Tsuchiya T, Kashima M, Hattori

A, Ito T. The RNA-binding protein Msi2 regulates autophagy during myogenic differentiation. *Life Sci Alliance* 7 (5): e202302016 (2024).

Presentations

Ito T. BCAA metabolism regulates tumor cell function, The 97th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society. Invited. Nov 7, 2024.

Ito T. BCAA regulation of stem cell potential. The 10th Annual Meeting on Cancer Metabolism. Invited. Aug 1, 2024.

Hattori A. アミノ酸代謝変化を介したがん悪性化機構の理解, The 76th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Invited, Jul 17, 2024.

Yamamoto Y, Nakagawa M, Glushka J, Maeno A, Fukuda M, Kaji H, Toguchida J, Edison AS, Nakatani F, Alman B, Ito T, Hattori A. BCAA Metabolic Reprogramming and Malignant Transformation in Chondrosarcoma, The 10th Annual Meeting on Cancer Metabolism. Aug 1, 2024.

Matsuura K. 腫瘍内分岐鎖アミノ酸不均一性と代謝依存的なトリプルネガティブ乳がん悪性化制御機構についての解析, The 47th Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan. Nov 29th, 2024.

Matsuura K. Activated branched-chain amino acid metabolism regulates the aggressive nature in human triple negative breast cancer, 19th International Symposium of The Institute Network. Invited. Oct 11th, 2024.

Matsuura K., Kuroda I., Shinonaga R., Yamamoto M., Inoue J., Hattori A., Imamura H., and Ito T. 分岐鎖アミノ酸代謝依存的な乳がん悪性化制御機構についての解析, The 10th Annual Meeting on Cancer Metabolism. Aug 1st, 2024.

Shinonaga R., Kishimoto A., Matsuura K., Hattori A., and Ito T. Functional roles of metabolic reprogramming of branched-chain amino acids on epigenome in myeloid leukemia, The 83rd Annual Meeting of Japanese Cancer Association. Sep 19th, 2024.

Shinonaga R., Kishimoto A., Matsuura K., Hattori A., and Ito T. 分岐鎖ケト酸代謝物による白血病幹細胞の未分化性制御機構の解明, The 10th Annual Meeting on Cancer Metabolism. Aug 1st, 2024.

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) アルツハイマー病 (AD) モデルマウスの認知機能異常の背景にある内部モデルの数理モデル検証

構造学習モデルを用いた神経変性疾患モデル動物における内部モデルの数理モデリングと早期病態検出の方法論を開発した。アルツハイマー病 (AD) は、認知症の主な原因であり、早期発見と介入によって軽減できる可能性がある。しかしながら、AD の早期段階における微妙な認知変化を評価することは依然として困難である。計算論的モデリングは、仮定される複数の変数を用いて、こうした微細な行動変化の背後にある生成過程を説明するための有望なアプローチである。しかし、AD においては、患者の推論過程に内在するモデル (internal model) に関する研究はまだ十分に進んでいない。測定可能な病理学的状態と行動表現型との間に位置する内部モデルの状態を明らかにすることで、行動評価のみにとどまらず、病初期の生成過程に関する理解が進むと考えられる。本研究では、潜在因子モデル (latent cause model) を内在モデルとして仮定し、そのモデルパラメータによって定義される内部状態を、観察可能な行動表現型と結び付けて推定した (Fig.1)。6 カ月および 12 カ月齢の App^{NL-G-F} ノックイン AD モデルマウスおよび年齢を揃えた対照マウスに対し、古典的恐怖条件づけ、消去、および再燃から構成される記憶修飾学習課題を実施した。その結果、 App^{NL-G-F} マウスは恐怖記憶の再燃の程度が低いことが明らかとなった。計算論的モデリングによって、この認知機能異常は、 App^{NL-G-F} マウスの内部状態が、観察の過剰な一般化または過剰な分化に偏っており、競合する記憶が保持されなかったことに起因する可能性が示唆された。この行動異常は、バーンズ迷路の反転課題でも再現

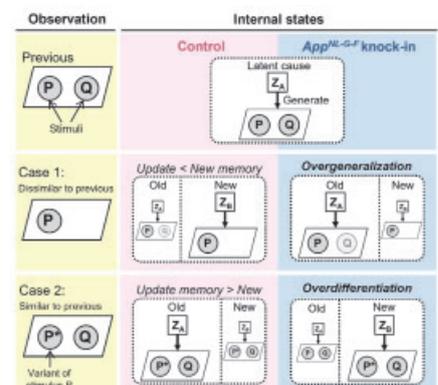


Fig. 1. A latent cause model as the internal model and estimated internal states

された。反転学習後、空間手がかりが与えられた *App*^{NL-G-F} マウスは、試行中に2つのゴール位置に関する共存する記憶を推論するが困難であった。以上の結果から、*App*^{NL-G-F} マウスの変化した内部状態は、記憶修飾過程における誤った分類を示していると結論付けた。この新しいアプローチは、早期 AD における認知変化を正確に評価し、早期介入がどのように作用するかを多次的に評価するために、内部状態の検討が有用であることを示している。

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) Mathematical Modeling of Internal Models Underlying Cognitive Impairments in an Alzheimer's Disease (AD) Mouse Model

We developed a methodology for mathematically modeling internal models in animal models of neurodegenerative diseases using a structure learning model, with the aim of enabling early detection of pathological changes. Alzheimer's disease (AD), the leading cause of dementia, may be alleviated through early detection and intervention. However, assessing subtle cognitive changes during the early stages of AD remains challenging. Computational modeling is a promising approach to explain the generative processes underlying such subtle behavioral changes by incorporating multiple hypothetical variables. Nevertheless, internal models representing the patient's reasoning process have not been sufficiently investigated in the context of AD. Clarifying the internal model states that lie between measurable pathological conditions and observable behavioral phenotypes may advance our understanding of the generative processes involved in early disease stages beyond what can be assessed through behavior alone.

In this study, we assumed a latent cause model as the internal model and estimated the internal states—defined by the model parameters—in conjunction with observable behavioral phenotypes. We subjected 6- and 12-month-old *App*^{NL-G-F} knock-in AD model mice and age-matched control mice to a memory modification learning task consisting of classical fear conditioning, extinction, and reinstatement. As a result, the *App*^{NL-G-F} mice exhibited a significantly lower level of fear memory reinstatement compared to controls. Computational modeling suggested that this cognitive impairment may be due to biased internal states in *App*^{NL-G-F} mice—either toward overgeneralization or over-differentiation of observed information—leading to failure in retaining competing memories.

This behavioral abnormality was also replicated in a reversal learning version of the Barnes maze task. After reversal learning, the *App*^{NL-G-F} mice, when provided with spatial cues, showed difficulty in inferring coexisting memories for the two goal locations during the trial. Based on these findings, we concluded that

the altered internal states in *App^{NL-G-F}* mice led to misclassification processes in memory modification learning. This novel approach highlights the utility of investigating internal states to accurately assess cognitive changes in the early stages of AD and to multidimensionally evaluate how early interventions may exert their effects.

List of Publications

Mei-Lun Huang, *Suzuki, Y., Sasaguri, H., Saito, T., Saido, T.C., *Imayoshi, I. (2025) Misclassification in memory modification in *App^{NL-G-F}* knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *eLife* (Reviewed preprint, revised) <https://doi.org/10.7554/eLife.105347.1>

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

ナノ生物工学分野
Laboratory of Nano Bioengineering

教授	新宅 博文	Prof.	Hirofumi Shintaku
助教	金子泰洸ポール	Assist. Prof.	Taikopaul Kaneko
助教	峯岸 美紗	Assist. Prof.	Misa Minegishi

本分野では、細胞集団が如何にして複雑な生命機能を創発するのか？という根源的な問いに対して、生体システムの基本単位である細胞の仔細な特徴を捉える 1 細胞解析法を開発することで、1 細胞から個体にわたる階層横断的な生命現象の理解を目指している。2024 年度においては、細胞機能とオミクスの大規模同時計測法の開発を進め、空間トランスクリプトームに必要な極微量流体制御を可能にするマイクロ流体シーケンス自動システム MiSA (microfluidic sequence automation) を開発した。また、細胞形態と遺伝子発現の統合解析を可能にする opto-combinatorial index 法を開発した。さらに、力学的拘束環境下のがん細胞の性状と遺伝子発現を大規模に解析可能な MECH-seq (micro-mechanical environmental cytometry with hydrogel-beads and sequencing) 法を開発した。

1) 極微量流体制御を実現するマイクロ流体シーケンス自動システム MiSA の開発

生命科学をはじめとする様々な研究分野において、実験の自動化を実現する極微量流体制御技術が求められている。我々は、さまざまな実験系に対応可能なオープンソースのマイクロ流体シーケンス自動化システム (MiSA) を開発した。MiSA は、圧力に基づくフィードバック制御によって一定の流量を維持し、10 チャネルの独立流体制御や、圧力バルブの高速開閉による過渡的な流れ制御にも対応する。我々はこの MiSA を用いて、多重ハイブリダイゼーションに基づく *in situ* シーケンシングの自動化を実証した。

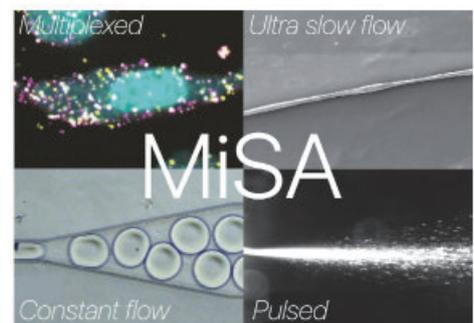


Fig. 1. MiSA for diverse applications

さらに、2 系統の圧力制御を用いたオープンループ流量制御への拡張により、微小液滴生成と 1 細胞封入、クモ糸タンパクのマイクロ流体紡糸、Cryo-EM (cryo-electron microscopy) 観察のためのタンパク溶液の極微量噴霧といった多種の目的にも適用可能であることを示した (Fig. 1)。

2) 細胞形態と遺伝子発現の統合解析を可能にする opto-combinatorial index 法の拡張

細胞の多様性の解析において、1 細胞遺伝子発現解析 (scRNA-seq) と顕微鏡観察はどちらも基盤的な手法であり、それぞれ定量かつ網羅的な mRNA 発現情報と、形態や局在情報といった相補的な情報を提供する。我々はこれまでに、細胞と mRNA を捕捉するハイドロゲルビーズそれぞれ

に蛍光色と DNA バーコードを用いたインデックスを付与し（カラーコード）、両者の組み合わせから細胞画像と 1 細胞遺伝子発現情報を統合する opto-combinatorial index 法を開発した (Tsuchida et al. Lab Chip 2024)。2024 年度は、この opto-combinatorial index 法を拡張し、多ターゲット化およびマルチプレックス数の増大に取り組んだ。蛍光タンパク質と蛍光カラーコードのスペクトルを分離することで、細胞周期を示す 2 色の蛍光タンパクの観測と、細胞に付与した 16 色の蛍光カラーコードの識別を両立させた。さらに、ハイドロゲルビーズのカラーコードの多層読み出しシステムを新たに設計することで、ビーズのカラーコード数を従来の 16 色から 64 色への拡張し、最大で 1,024 細胞のマルチプレックス解析を実現した。現在、この拡張した opto-combinatorial index 法を用いて、CDK4/6 阻害剤によって誘導される乳がん細胞の細胞周期停止における細胞間不均一性の分子カスケードの解析を進めている。

3) 力学的拘束下細胞の大規模解析を実現する MECH-seq 法の開発

全ての細胞は増殖する際に、周辺の細胞や組織から力学的な拘束を受ける。これまでの先行研究から力学的拘束ががん細胞を休眠状態に誘導し、治療抵抗性の獲得に関与することが示唆されている。しかし、力学的環境ががん細胞の状態遷移に及ぼす影響を定量的かつ網羅的に解析する手法はこれまで存在しなかった。そこで、力学的拘束下のがん細胞の性状と遺伝子発現の大規模な解析を実現するために、MECH-seq 法を開発した。本手法は、直径約 90 μm のアガロース微小ゲルビーズ内のがん細胞を 1 細胞ずつ内包することで力学的微小環境を再構成する。細胞はゲル内で増殖するにつれて体積が増加し、それに伴って周囲のゲルにより力学的拘束を受ける。アガロースゲルを微小ビーズ化することで、内部の細胞に対するガスや栄養の交換効率を高め、低酸素や栄養欠乏といった力学的要因以外の影響を排除する。本システムは、フローサイトメトリーを用いた大規模な細胞性状解析に加え、1 細胞遺伝子発現解析も可能にする。MECH-seq をヒト乳がん細胞株 MCF7 に適用し、力学的拘束によって休眠状態へ移行することが示唆された。本手法により、がん細胞が力学環境を感知し、休眠状態へ移行する機構の解明を目指す。

Our laboratory aims to develop various approaches to profile the state of single cells, the fundamental units of life, for understanding how a group of heterogenous cells can create organized biological systems. We here introduce our achievements in FY 2024.

1) Development of MiSA: an open-source microfluidic sequence automation system for multiplexed ultralow-volume fluid control

Multiplexed fluid control is a demanding task in various life sciences and bioengineering research. We have developed an open-source microfluidic sequence automation (MiSA) that offers flexible and multiplexed fluid control for various applications, providing a constant flow rate via pressure-based feedback control with 10-plex capability and transient flow by rapidly opening and closing pressure valves. MiSA is self-contained, including a pressure source, and employs an Arduino Micro to integrate ten solenoid valves, an off-the-shelf

pressure regulator, and a flow sensor to balance cost and reliability. We have demonstrated the practical use of MiSA for multiplexed chemical reactions by performing the hybridization-based *in situ* sequencing. To demonstrate the flexibility of MiSA, we have also demonstrated the extensions of our system for two pressure regulations under open-loop control in the flow rate by demonstrating three independent applications for droplet generation, microfluidic spinning of spider silk fiber, and atomization of protein solution. We envision that this open source will offer resources for researchers to quickly explore microfluidic applications with an affordable investment.

2) Expanding the capacity of opto-combinatorial indexing for multimodal single-cell analysis

Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and image-based phenotyping offer complementary insights into cellular heterogeneity: scRNA-seq provides quantitative, genome-wide mRNA expression profiles, whereas imaging reveals detailed morphological features and spatial context. To bridge these modalities, we previously developed an opto-combinatorial indexing strategy that connects image-derived phenotypes with transcriptomic data. This approach employs a dual coding system—comprising fluorescent and DNA barcode-based indices—to label both individual cells and mRNA-capturing hydrogel beads, enabling robust phenotype-transcriptome linkage (Tsuchida et al., Lab Chip, 2024).

In FY2024, we expanded the fluorescence channels to enable multi-target detection and enhanced multiplexing by spectrally unmixing signals from fluorescent proteins and color codes. The updated method allows simultaneous tracking of two fluorescent proteins indicative of cell cycle states, along with identification of 16 distinct color codes assigned to individual cells. Additionally, we increased the number of bead-associated color codes from 16 to 64 by implementing a multilayer decoding system, thereby enabling multiplexed analysis of up to 1,024 cells in a single assay. We applied this extended platform to dissect the molecular cascade underlying cell-to-cell heterogeneity during CDK4/6 inhibitor–induced cell cycle arrest in breast cancer cells.

3) Development of MECH-seq: a platform for large-scale profiling of mechanically confined cancer cells

During proliferation, cancer cells are mechanically confined by neighboring cells and surrounding tissues. Prior studies suggest that such confinement can induce cellular dormancy, a state associated with therapeutic resistance. However, methods to quantitatively and comprehensively assess how the mechanical microenvironment drives cell state transitions have been lacking. To address this, we developed MECH-seq, a platform for high-throughput phenotypic and transcriptomic profiling of mechanically confined cancer cells.

In MECH-seq, individual cancer cells are encapsulated in ~90 μm agarose microbeads using a microfluidic device. As cells proliferate within the beads, they expand against the surrounding gel matrix, simulating mechanical compression. The miniaturized and uniform gel architecture allows efficient gas and nutrient exchange, thereby isolating the effects of mechanical confinement from confounding factors such as hypoxia or nutrient deprivation.

This system supports both large-scale phenotypic screening via flow cytometry and single-cell gene

expression profiling under well-defined mechanical constraints. Applying MECH-seq to the human breast cancer cell line MCF7 revealed gene expression signatures consistent with dormancy induction under confinement. MECH-seq thus provides a robust framework to dissect how cancer cells sense mechanical cues and how these cues influence their transition into a dormant state.

List of Publications

Hiroshi Kanno, Kotaro Hiramatsu, Hideharu Mikami, Atsushi Nakayashiki, Shota Yamashita, Arata Nagai, Kohki Okabe, Fan Li, Fei Yin, Keita Tominaga, Omer Faruk Bicer, Ryohei Noma, Bahareh Kiani, Olga Efa, Martin Büscher, Tetsuichi Wazawa, Masahiro Sonoshita, Hirofumi Shintaku, Takeharu, Nagai, Sigurd Braun, Jessica P. Houston, Sherif Rashad, Kuniyasu Niizuma, and Keisuke Goda, High-Throughput Fluorescence Lifetime Imaging Flow Cytometry, *Nature Communications*, 15 (2024), 7376 (15 pages).

Akifumi Shiomi, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Arata Tsuchida, Takashi Isoshima, Mayuko Sato, Kiminori Toyooka, Kentaro Doi, Hidekazu Nishikii, and Hirofumi Shintaku, High-throughput Mechanical Phenotyping and Transcriptomics of Single Cells, *Nature Communications*, 15 (2024), 3812. (13 pages)

Arata Tsuchida, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Mayu Kawasaki, Ryuji Yokokawa, and Hirofumi Shintaku, Opto-combinatorial Indexing Enables High-content Transcriptomics by Linking Cell Images and Transcriptome, *Lab on a Chip*, Vol.24 (2024), pp. 2287-2297.

Jianming Chen, Arata Tsuchida, Ali D. Malay, Kousuke Tsuchiya, Hiroyasu Masunaga, Yui Tsuji, Mako Kuzumoto, Kenji Urayama, Hirofumi Shintaku, and Keiji Numata, Replicating Shear-mediated Self-assembly of Spider Silk through Microfluidics, *Nature Communications*, 15 (2024), 535. (11 pages)

List of Presentations

新宅 博文, ナノ界面動電現象を利用した1細胞RNA動態解析, 第24回日本再生医療学会総会, シンポジウム「4次元解析から明らかになる細胞の動態」, 横浜市, 2025年3月20-22日. (招待講演)

近藤 桂祐, 野崎 佳司, 峯岸 美紗, 新宅 博文, 浸潤能が異なる乳がん細胞が示す力学的拘束に対する応答の多様性, 日本機械学会関西支部2024年度関西学生会卒業研究発表講演会, 堺市, 2025年3月18日.

村井 潤一, 金子 泰洗 ポール, 峯岸 美紗, 新宅 博文, 時空間トランスクリプトミクスのための極微量流体制御装置の開発, 日本機械学会関西支部2024年度関西学生会卒業研究発表講演会, 堺市, 2025年3月18日.

Hirofumi Shintaku, Nano-electrokinetic transcriptomics empowers the phenotyping of single cells, Korea University, 21st February (2025). (Invited talk)

Hirofumi Shintaku, Nano-electrokinetic transcriptomics empowers the phenotyping of single cells, International KNU G-LAMP Symposium on Transcriptomics, 20th February (2025). (Invited talk)

Keiji Nozaki, Misa Minegishi, Mahmoud N. Abdelmoez, Kaori Nishikawa, and Hirofumi Shintaku, Molecular mechanisms behind the dormant state of cancer cells in a mechanical microenvironment, Global Young Scientist Summit 2025, Singapore, 6th-10th January (2025).

Hirofumi Shintaku, Nano-electrokinetic transcriptomics to link gene expressions to single-cell behaviors, Human Cell Atlas Asia General Meeting, 3rd December (2024). (Invited talk)

峯岸 美紗, 野崎 佳司, アブデルモエズ マハムド, 西川 香里, 新宅 博文, 力学的制約による乳がん細胞の増殖状態から休眠状態へ至るダイナミクスの分子機構, 第 15 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 宮城, 2024 年 11 月 27 日.

峯岸 美紗, 新宅 博文, 三次元がん微小環境下における 1 細胞の遺伝子発現と動態の統合解析, 第 15 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 宮城, 2024 年 11 月 27 日. (招待講演)

峯岸 美紗, 新宅 博文, 口丸 高弘, 分泌・再構成型蛍光標識技術を用いたがん近傍組織細胞の詳細解析, 第 11 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス, 東京, 2024 年 11 月 15 日. (招待講演)

Hirofumi Shintaku, Nanoscale electrokinetics empowers mechano phenotyping of single cells, Lab-on-a-Chip, Microfluidics, & Organ-on-a-Chip Asia 2024, 7th November (2024). (Invited talk)

Hirofumi Shintaku, Nanoelectrokinetics dissects dynamic functions of single cells, the Hong Kong University of Science and Technology, 1st November (2024). (Invited talk)

Arata Tsuchida, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Mayu Kawasaki, and Hirofumi Shintaku, Opto-combinatorial indexing reveals the distinct transcriptomic responses associated with paclitaxel-induced multinuclear formation by linking cellular images and transcriptomes, The 30th East Asia Joint Symposium, Taipei, Taiwan, 29th October-1st November (2024).

Arata Tsuchida, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Mayu Kawasaki, and Hirofumi Shintaku, Expanding the capacity of opto-combinatorial indexing for multimodal single-cell analysis, The 28th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences -Micro-Total Analysis Systems (μ TAS 2024), Montreal, Canada, 13th-17th October (2024).

Misa Minegishi, Keiji Nozaki, Kaori Nishikawa, Takahiro Kuchimaru, and Hirofumi Shintaku, Tools for analyzing cancer cell interactions with their surrounding microenvironments, The 19th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences, Sendai, Japan, 10th-11th October (2024).

新宅 博文, ナノ界面動電現象を活用した 1 細胞機能と mRNA 発現の接続, 第 44 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2024), 札幌市, 2024 年 10 月 10 日. (招待講演)

Akifumi Shiomi, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Dino Di Carlo, and Hirofumi Shintaku, Integration of mechanical phenotyping and transcriptomics by ELASTomics and MECHANomics, The 52nd Naito Conference, Sapporo, Japan, 1st-4th October (2024).

Mahmoud N. Abdelmoez, Keiji Nozaki, Misa Minegishi, and Hirofumi Shintaku, High throughput replication of the in-vivo mechanical confinement of dormant cancer cells through microbead encapsulation, 第4回研究交流サロン, 京都市, 2024年9月26日.

Misa Minegishi, Keiji Nozaki, Mahmoud N. Abdelmoez, Kaori Nishikawa, Takahiro Kuchimaru, and Hirofumi Shintaku, Tools for dissecting interactions between cancer cells and their surrounding microenvironment, 第4回研究交流サロン, 京都市, 2024年9月26日. (Invited talk)

野崎 佳司, 峯岸 美紗, 西川 香里, 新宅 博文, マイクロハイドロゲルの力学的制約により休眠誘導されたがん細胞の大規模解析, 日本機械学会 2024 年度年次大会, 松山市, 2024 年 9 月 10 日.

Hirofumi Shintaku, Mechanical phenotyping of single cells via nano-electrokinetics, ASM Chapter Seminar, University of Central Florida, 26th August (2024). (Invited talk)

Hirofumi Shintaku, Linking single-cell behaviors to transcriptomics via nano-electrokinetics, RNA Club, University of Florida, 22nd August (2024). (Invited talk)

Hirofumi Shintaku, Linking cellular behaviors to transcriptomics at single-cell resolution, The 19th International Workshop on Biomaterials in Interface Science, Interface Summer Seminar, 5th August (2024). (Invited talk)

Akifumi Shiomi, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, Dino Di Carlo, and Hirofumi Shintaku, Combined analysis of static and dynamic cell-mechanics with unbiased transcriptomics for thousands of single cells, the 21st IUPAB and 62nd BSJ Joint Congress 2024 (IUPAB 2024), Kyoto, Japan, 24th-28th June (2024).

Misa Minegishi, Keiji Nozaki, Kaori Nishikawa, and Hirofumi Shintaku, A high-throughput analysis of cancer-cell dormancy under mechanical confinement with micro-hydrogel beads, the 21st IUPAB and 62nd BSJ Joint Congress 2024 (IUPAB 2024), Kyoto, Japan, 24th-28th June (2024). (Invited talk)

峯岸 美紗, 門之園 哲哉, 近藤 科江, 近接細胞蛍光標識技術を用いた転移微小環境内でがん細胞と周辺細胞相互作用の解析, 第28回日本がん分子標的治療学会学術州会, 江東区, 2024年6月20日.

Akifumi Shiomi, Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, and Hirofumi Shintaku, Combined analysis of static and dynamic cell mechanics with unbiased transcriptomics for thousands of single cells, International Symposium on Mechanical Control of Biological Self-organization, Kyoto, Japan, 17th-18th June (2024).

Keiji Nozaki, Misa Minegishi, Kaori Nishikawa, and Hirofumi Shintaku, Profiling proliferation phenotype of cancer cells under micro-mechanical confinement with cytometry and sequencing, International Symposium on Mechanical Control of Biological Self-organization, Kyoto, Japan, 17th-18th, June (2024).

Awards

塩見晃史, 金子泰洸ポール, 西川香里, 新宅博文, 理研梅峰賞 理化学研究所, 細胞の力学特性と遺伝子発現の統合解析法の開発, 2025年3月.

新宅博文, 中谷賞奨励賞 公益財団法人中谷財団 ナノ・マイクロ工学による1細胞オミクスの拡張と展開, 2025年2月.

Akifumi Shiomi, Serendipity Award 2024, Serendipity Lab, 2025年2月16日.

峯岸美紗, 若手優秀講演表彰, 日本機械学会 マイクロ・ナノ工学部門, 力学的制約による乳がん細胞の増殖状態から休眠状態へ至るダイナミクスの分子機構, 2024年12月16日.

野崎佳司, 日本機械学会若手優秀講演フェロー賞, 日本機械学会, マイクロハイドロゲルの力学的制約により休眠誘導されたがん細胞の大規模解析, 2024年12月16日.

塩見晃史, ファイナリスト認定証, 日本機械学会 マイクロ・ナノ工学部門, The mechanical phenotyping integrated with transcriptomics for single cells, 2024年11月27日.

Taikopaul Kaneko, Outstanding Young Scientist TOMY Award, The 30th East Asia Joint Symposium, Opto-combinatorial indexing reveals the distinct transcriptomic responses associated with paclitaxel-induced multinuclear formation by linking cellular images and transcriptomes, 2024年10月31日.

Misa Minegishi, The Poster Award at the 19th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences in Sendai, Tools for analyzing cancer cell interactions with their surrounding microenvironments, 2024年10月12日.

金子泰洸ポール, ポスター賞, 京都大学 医生物学研究所 2024年度リトリート, Developing non-toxic spatial-temporal single-cell RNA-seq using nano-electroporation, 2024年9月3日.

塩見晃史, YORC 発表賞, JST-CREST 多細胞 若手の会 2024, High-throughput mechanical phenotyping and transcriptomics of single cells, 2024年8月27日.

峯岸美紗, YORC 発表賞, JST-CREST 多細胞 若手の会 2024, 微小細胞外基質を用いた細胞動態と遺伝子発現の大規模統合解析による休眠を介した再発転移機構の解明, 2024年8月27日.

峯岸美紗, 若手招待講演賞, 日本生物物理学会, Combined analysis of static and dynamic cell-mechanics with unbiased transcriptomics for thousands of single cells, 2024年6月27日.

Akifumi Shiomi, IUPAB2024 Student and Early Career Researcher Poster Award, A high-throughput analysis of cancer-cell dormancy under mechanical confinement with micro-hydrogel beads, 2024年6月28日.

老化感染制御学分野

Laboratory of Aging and Infection Control

教授 中台（鹿毛）枝里子 Prof. Eriko Kage-Nakadai
助教 谷本 佳彦 Assist. Prof. Yoshihiko Tanimoto

本分野では、老化および感染のメカニズムを理解して、食や常在微生物を介してそれらを制御する方法の構築を目指している。私たちはこれまでに、線虫 *Caenorhabditis elegans* やマウスをモデル生物として、常在微生物叢と宿主の相互作用のメカニズムの一端を明らかにしてきた。腸内細菌叢は炎症を制御しうるツールとしても魅力的である。私たちは、下痢原性がクローズアップされることの多い大腸菌の中に、炎症性サイトカインの誘導抑制活性を示す菌株群があることを見出している。さらに、老化と密接に関わるミトコンドリアに着目して、ミトコンドリア活性をイメージングする方法の開発や、ミトコンドリアを標的として寿命を延伸する手法の開発にもチャレンジしている。

1) 分散接着性大腸菌による炎症性サイトカイン抑制機構の解明

これまでに、小児下痢症の原因菌の一つとして考えられている分散接着性大腸菌（Diffusely Adherent *E. coli*, DAEC）が下痢症患者だけでなく健康者からも分離されること、炎症反応を誘発する菌株だけでなく、逆に抑制する菌株が存在することを発見した。炎症抑制株の1つである SK1144 は、その炎症抑制能が特に優れていることから、本研究では SK1144 株を中心に検討を進めている。遺伝子ノックアウトおよび補完実験から、VI 型分泌装置の構成タンパク質の一つであり、エフェクターとしての機能も報告されている Hcp を候補の一つとして見出している (Fig. 1)。Hcp の他にも因子が想定されるため、SK1144 にトランスポゾン Tn5 をランダムに挿入した変異株ライブラリを作製し、炎症抑制機能を喪失

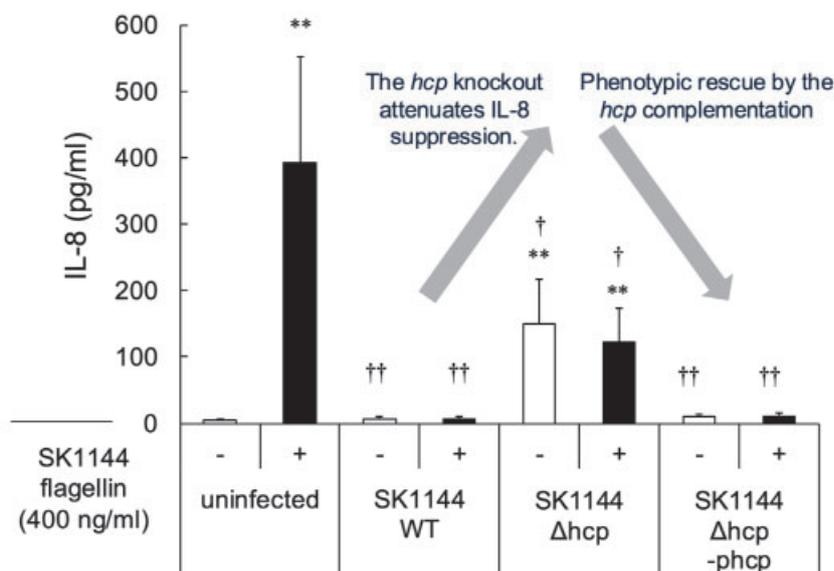


Fig. 1. Loss of IL-8 suppressive ability of Hcp gene mutant strain.

した変異株をスクリーニングした。今年度は、トランスポゾン Tn5 挿入変異株ライブラリから、炎症抑制機能を喪失した変異株をスクリーニングした。その結果、炎症抑制機能を完全に喪失した 15 株を得た。トランスポゾン挿入部位を決定し、炎症抑制に関わる遺伝子群を同定することに成功した。

2) ミトコンドリア活性の可視化に向けた基盤技術開発

抗老化の重要な標的の一つにミトコンドリアがある。我々は蛍光ナノダイヤモンドを用いた *in vivo* 局所温度測定技術を開発し、生きた線虫体内のミトコンドリアの発熱を世界で初めてリアルタイムに捉えた (Fujiwara *et al.* 2020 *Science Advances*)。よってミトコンドリア活性を、局所的発熱量として物理的に捉えられる可能性がある。他方、蛍光ナノダイヤモンドの線虫体内への導入には、ガラスキャピラリーを用いたマイクロインジェクションを行う必要があり、全身イメージング実現の障壁となっていた。本研究では、蛍光ナノダイヤモンドを経口的に投与して、線虫体内全体に取り込ませる方法の確立を目指して、まず、安価な超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (SPION) を用いた検討を行った。その結果、正に荷電した SPION では線虫への取り込み効率が向上することを実証した (Zou *et al.* 2024 *Chemosphere*) (Fig. 2)。

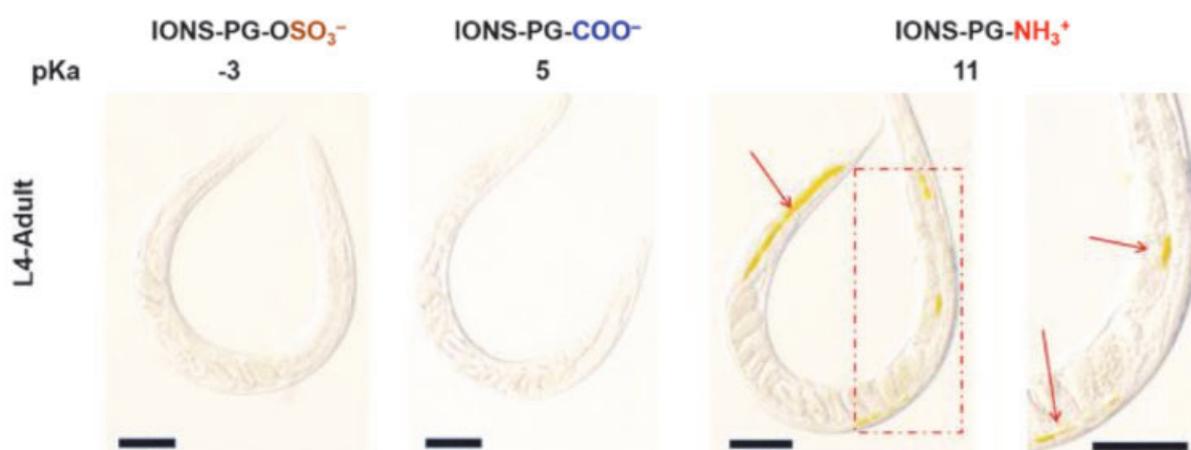


Fig. 2. IONS-PG-NH₃⁺ were accumulated in *C. elegans*.

We are studying the mechanisms of aging and infection, and how to control them via food and microbiota. We have elucidated the mechanisms of the interaction between the microbiota and the host using *Caenorhabditis elegans* and mice as model organisms. The gut microbiota is also attractive as a tool to potentially control inflammation. In recent years, inflammatory bowel disease has been on the rise, and we have found that some strains of *Escherichia coli*, which are often highlighted for their diarrheagenic properties, show inhibitory activity in the induction of inflammatory cytokines. We are also focusing on mitochondria, which are closely related to aging. We are challenging the development of methods for imaging mitochondrial activity and developing methods to extend lifespan by targeting mitochondria.

1) Mechanism of inflammatory cytokine suppression by diffusely adherent *E. coli*, DAEC

We have discovered that Diffusely Adherent *E. coli* (DAEC), which is thought to be one of the causative agents of childhood diarrhea, can be isolated not only from diarrhea patients but also from healthy individuals, and that there are not only strains that induce inflammatory responses but also those that suppress them. Since SK1144, one of the inflammation-suppressing strains, is particularly superior in its ability to suppress inflammation, this study focuses on the SK1144 strain. From gene knockout and complementation experiments, we have found Hcp, which is one of the component proteins of the type VI secretion system and has been reported to function as an effector, as one of the candidates. Since other factors besides Hcp were assumed, a library of mutant strains was generated by randomly inserting transposon Tn5 into SK1144 and screened for mutants with loss of inflammation suppression function. We screened mutants with loss of inflammatory suppressive function from the transposon Tn5 insertion mutant library. As a result, we obtained 15 strains with complete loss of inflammation suppressor function. We determined the transposon insertion sites and succeeded in identifying a group of genes involved in inflammation suppression.

2) Development of basic technology for visualization of mitochondrial activity

One of the important targets for anti-aging is the mitochondrial quality control mechanism. The number of damaged mitochondria increases with age, and one of the causes of this increase is thought to be a decline in mitophagy function. Therefore, the development of methods to maintain and improve mitochondrial quality could be a strategy for controlling aging that can be extrapolated to humans. We have developed an in vivo local temperature measurement technique using fluorescent nanodiamonds, and for the first time in the world, mitochondrial heat generation in living *C. elegans* was captured in real time (Fujiwara *et al.* 2020 Science Advances). Thus, there is a possibility that mitochondrial activity can be physically captured as local heat generation. On the other hand, the introduction of fluorescent nanodiamonds into the nematode body requires microinjection using a glass capillary, which has been a barrier to the realization of whole-body imaging. In this study, we first investigated the use of inexpensive superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) to establish a method to orally administration of fluorescent nanodiamonds. As a result, the charged SPIONs improved the efficiency of uptake into *C. elegans* (Zou *et al.* 2024 Chemosphere) (Fig. 2).

List of Publications

- Hashimoto M, Tanimoto Y, Chen YL, Wada T, Kage-Nakadai E. (2025). Complete genome sequence of *Lactiplantibacillus brownii* strain MH-1 isolated from Japanese traditional homemade pickled Chinese cabbage. **Microbiol Resour Announc** 14, e0106424
- Ali MS, Ahmed S, Tanimoto Y, Wada T, Kage-Nakadai E. (2025). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* boosts stress resistance and host defense mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. **J Appl Microbiol** 136, lxaf016.

Zou Y, Shikano Y, Nishina Y, Komatsu N, Kage-Nakadai E, Fujiwara M. (2024). Size, polyglycerol grafting, and net surface charge of iron oxide nanoparticles determine their interaction and toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere** 358, 142060.

Matsuda A, Ishida T, Tanimoto Y, Wada T, Kage-Nakadai E. (2024). Pathogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host. **Biosci Biotechnol Biochem** 88, 453-459.

Takeuchi S, Ali MS, Tanimoto Y, Kage-Nakadai E. (2024). *Lactococcus kimchii* extends lifespan and alleviates motility decline in *Caenorhabditis elegans* through *ins-20*, an insulin-like peptide gene. **Biosci Microbiota Food Health** 43, 267-274.

List of Presentations

Tanimoto Y, Mori A, Nomoto R. The epidemic genotypes of human adenoviruses based on whole genome analysis in infectious disease surveillance in Kobe City, Japan. The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep 17-19, 2024.

野本 唯菜、和田 崇之、谷本 佳彦、中台（鹿毛）枝里子 *Akkermansia muciniphila* 給餌が線虫の寿命及び脂肪蓄積に及ぼす影響 第47回日本分子生物学会年会、福岡、2024年11月26-29日

千葉 喬子、石川 清琉、太田 茜、久原 篤、谷本 佳彦、中台（鹿毛）枝里子 線虫 *C. elegans* を用いたピペリンに対する嗜好のメカニズムと生理機能の解明 第47回日本分子生物学会年会、福岡、2024年11月26-29日

筑波 叶夢、和田 崇之、谷本 佳彦、中台（鹿毛）枝里子 線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた *Christensenella minuta* 給餌による抗肥満効果の評価 第47回日本分子生物学会年会、福岡、2024年11月26-29日

山村 千夏、松田 晏理、和田 崇之、谷本 佳彦、中台（鹿毛）枝里子 線虫を代替モデル宿主とした毒素原性大腸菌の病原メカニズム解析 第47回日本分子生物学会年会、福岡、2024年11月26-29日

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

メカノセンシング生理学分野

Laboratory of Mechanosensory Physiology

教授 野々村恵子 Prof. Keiko Nonomura

本分野では、細胞のメカノセンシング（機械受容）機構に着目し、生体臓器における役割の解明をめざした研究を推進している（Fig. 1）。2024年においては、細胞膜の張力変化を検出するセンサータンパク質である PIEZO1/2 の発現および機能解析を行い、小脳の発生過程において PIEZO1 が神経の一種である顆粒細胞の移動の様式を制御することを明らかにした。

1) 脳の発生におけるメカノセンサー

チャンネル PIEZO1 の役割の発見

胎児期および生後発達期において臓器の大きさや形態は劇的に変化する。この際には組織内で特定の細胞集団が移動するなどの「細胞配置の秩序ある変化」が起こることが多い。我々はこのような組織発生における「細胞配置の秩序ある変化」には、機械受容の仕組みが関わりう

ると考えた。そこで、発生過程および生後発達期の組織において PIEZO1/2 の発現を解析した。その結果、出生直後の小脳において、神経の一種である小脳顆粒細胞に PIEZO1 mRNA が発現することを見出した。この時期の小脳顆粒細胞は細胞分裂により生み出され位置から離れ、小脳組織内を移動することが知られている。小脳顆粒細胞が移動するルートには他の細胞が密度高く存在する混み合った環境が含まれており、移動中の小脳顆粒細胞には核が変形するほどの力が加わることが知られていた。このような混み合った環境下での小脳顆粒細胞の移動に PIEZO1 が寄与する可能性を検証するために、共同研究により小脳顆粒細胞において PIEZO1 を欠損させたところ、混み合った環境の通過を達成する細胞の割合が減少した。また、小脳顆粒細胞が込み入った環境に入ると PIEZO1 の活性化が起こり、これによりもたらされるカルシウムの細胞質への流入が PKC-ezrin 経路を活性化し、これにより後方の細胞膜においてアクチオシンの集積と収縮力の発生がもたらすことが明らかにされた。これらの解析により小脳顆粒細胞が力学的に不均一な環境である組織内を移動する際に、駆動力を制御する機構としてメカノセンシングの仕組みを用いていることが明らかとなった。

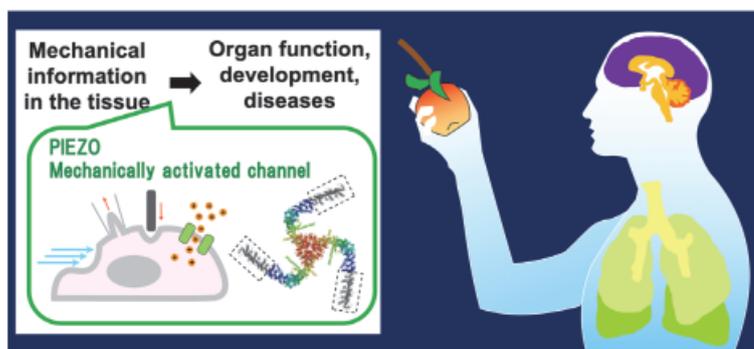


Fig. 1. Analysis of the roles of PIEZO1/2-mediated mechanosensation among organs

This laboratory aims to elucidate the physiological roles of mechanosensation among organs. In 2024, we revealed the role of mechanosensitive ion channel PIEZO1 as a controller of mode of cell migration during cerebellum development.

1) Elucidation of the role of mechanosensor channel PIEZO1 during migration of cerebellar granule cells.

During embryonic and postnatal developing stages, tissue morphology often changes a lot. In many cases, the ordered cell migration is associated with tissue morphological changes. We hypothesized that the mechanism of cellular mechanosensation may contribute to such ordered migration. We checked expression pattern of PIEZO1/2 in many developing tissues, and found that PIEZO1 is highly expressed in the cerebellar granule cells. Through collaborative research, it is revealed that activation of PIEZO1 happened in the granule cells during migration, inducing calcium influx in the soma triggers the PKC-ezrin cascade, which recruits actomyosin and transmits its contractile force to the posterior plasma membrane. These data demonstrate that newborn granule cells utilized the system of mechanosensation in order to adapt their motility modes in distinct extracellular environments in the developing brain.

List of Publications

Nakazawa, N., Greci, G., Kameo, Y., Takeda, N., Sawada, T., Kurisu, J., Zhang, Z., Toma, K., Adachi, T., Nonomura, K., and Kengaku, M. (2025). PIEZO1-dependent mode switch of neuronal migration in heterogeneous microenvironments in the developing brain. *Cell. Rep.* 44 (3):115405.

List of Presentations

Endo, H., Tanaka, T., and Nonomura, K. Analysis of the involvement of mechanosensor channel PIEZO in cerebrospinal fluid homeostasis and its effect on the brain development/function. The 54th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Kyoto, June 19-22, 2024.

Nonomura, K. and Okamoto, M. PIEZO-mediated control of cell proliferation and tissue mechanics in the developing cerebral cortex. The 97th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Yokohama, November 6-8, 2024.E

Ikeda, L., Tanaka, T., Endo, H. and Nonomura, K. Human iPS cells derived choroid plexus organoid for analysis of mechanosensation and physiological responses. The 47th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, November 27-29. 2024.

Nonomura K., Mechanosensory physiology of cell membrane. The 105th CSJ Annual Meeting, Osaka, March 26-29, 2025

情報制御分野

Laboratory of Regulatory Information

連携教授 藤田 尚志 Collaborative 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) B型肝炎ウイルス (HBV) の増殖機構の解析: HBV 感染マウスモデルの構築

HBV 感染は人の病気であり、重篤な慢性感染を引き起こし、肝硬変、肝がん、といった経過をたどる。基本的に人の肝臓で特異的に感染するウイルスであり、比較的最近になって侵入受容体 (ヒト胆汁酸トランスポーター、hNTCP) が同定された。しかし肝臓に hNTCP を発現するトランスジェニックマウスで HBV は増殖しないことが判明した。現在、実用可能な動物の感染モデルは存在しない。我々はこのトランスジェニックマウスでは自然免疫系が制限因子となっていると云う仮説を立て、HBV 感染のマウスモデルを作出する目的で、侵入受容体である hNTCP の遺伝子を導入し、かつ自然免疫関連の 6 つの遺伝子をノックアウトしたマウス (6KO+hNTCP マウス) を作成した。このマウスに HBV 感染患者血清由来 HBV を感染させた。感染後、約半年にわたって血清 HBV タンパク質、HBV DNA が検出された。また、抗 HBV タンパク質抗体の産生が認められた。感染半年後のマウスの肝臓には HBV タンパク質の組織染色があり、HBV DNA を抽出、遺伝子配列を決定した。以上より 6KO+hNTCP マウスは HBV 感染のマウスモデルとして有望であることが強く示唆された。

2) 抗 B型肝炎ウイルス薬剤の探索 (cccDNA を標的としたスクリーニング)

現在、慢性感染 HBV を根治する方法は確立されていない。その理由は HBV 複製サイクルの根幹である、エピソーム状の cccDNA を阻害する方法がないためである。我々は以下の原理による cccDNA を標的として阻害剤をスクリーニングする方法を考案した。レンチウイルスはインテグラーゼの働きで直鎖状の DNA は宿主ゲノム上に取り込まれて増殖を行う。インテグラーゼを欠損するとエピソーム状に存在する。このエピソームにルシフェラーゼ遺伝子を組み込みその発現を指標にスクリーニングを行なった。cccDNA 阻害剤のスクリーニング系によって複数の候補化合物が見出された。それらの化合物は、核酸アナログ製剤では抑制が難しかった細胞外での HBV タンパク質の放出をも阻害することができた。しかし、現在まで核酸アナログ製剤との併用効果および候補化合物の作用機序は分かっていない。独自に開発したエピソーム DNA (cccDNA を模倣) の阻害を指標とした阻害剤スクリーニング系を用いて 27,000 種の化合物から 2 種の化合物を得た。2 種のうち一種

は化学的に不安定なため排除し、残りの一種がHBV増殖を阻害することを確認した。その候補化合物の化合物展開を行ない、側鎖の改変によって、活性を保持したまま分子量を半分以下にまで低分化することができた。

We study on antiviral innate immunity, development of new therapy for viral infection. Below are our research projects.

1) Study on the mechanism of hepatitis B virus replication

We established hNTCP tg mice in which six genes correlated to innate immunity were knocked out (6KO+hNTCP mice). HBV infection experiments were performed in these mice using HBV infection sources derived from patient sera containing three genotypes, and HBV proteins and nucleic acids were successfully detected in the serum. In addition, anti-HBV proteins-antibodies were also detected. The liver was taken after infection, and expression of HBV proteins in the liver tissue was confirmed by tissue immunostaining. Although three genotypes were used as the source of infection, evaluation of HBV sequences after infection confirmed that only certain genotypes were infected. The above results confirmed HBV infection in 6KO+hNTCP mice retained acquired immunity, unlike human liver chimeric mice. Therefore, when HBV antibodies were measured in the serum, an increase or decrease in antibody levels were successfully detected after infection. This strongly suggests that antibody production may be induced by antigen exposure due to persistent infection.

2) Screening of anti-hepatitis B virus chemicals by using cccDNA inhibition assay

Currently, there is no available therapy to eradicate hepatitis B virus (HBV) in chronically infected individuals. This is due to the difficulty in eliminating viral covalently closed circular (ccc) DNA, which is central to the gene expression and replication of HBV. We developed an assay system for nuclear circular DNA using an integration-deficient lentiviral vector. This vector produced non-integrated circular DNA in nuclei of infected cells. We engineered this vector to encode firefly luciferase to monitor the lentiviral episome DNA.

We screened 27,000 chemicals by this assay for luciferase-reducing activity and identified two novel chemicals. We further chose one of them because the other appeared to be chemically unstable and confirmed that this chemical indeed inhibited HBV infection and replication. We modified the chemical structure of the chemical and succeeded to reduce its molecular mass to almost 50 %, without losing its biological activity.

List of Publications

Yoneyama, M., Kato, H., and Fujita, T. (2024). Physiological functions of RIG-I-like receptors **Immunity**. 2024, doi: 10.1016/j. immune.2024.03.003

List of Presentations

Takeuchi, F., Ikeda, S., Tsukamoto, Y., Koba, K., Shirasaka, Y., Akahori, Y., Chayama, K., Ablasser, A., Kato, H., Andino, R., and Fujita, T. Establishment of a novel mouse infection model of hepatitis B virus. The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Kyoto, September 17-19, 2024.

Shirasaka, Y., Takeuchi, F., Kato, H., and Fujita, T. A TNF-Synergistic Compound is Released During Encephalomyocarditis Virus Infection to Trigger Drastic Apoptosis. The 22nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Kyoto, September 17-19, 2024.

霊長類モデル分野
Laboratory of Primate Model

准教授 三浦 智行 Assoc. Prof. Tomoyuki Miura

2024年に人の異動はなく、研究員5名と人間・環境学研究科博士課程の学生2名が在籍している。

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)。2024年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

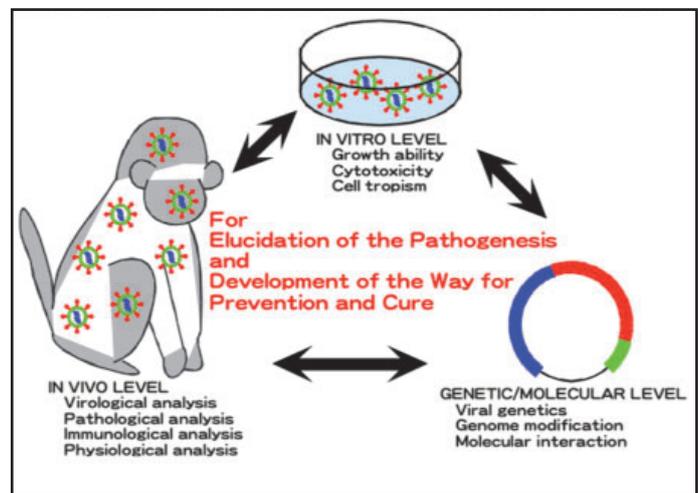


Fig. 1. Research Cycle of Primate Model for Infectious Diseases

SARS-CoV-2 変異株の中和における IgA および IgM の IgG に対する優位性の解析

我々は以前、SARS-CoV-2 に対し免疫グロブリン A (IgA) および免疫グロブリン M (IgM) が、同一の 8A5 クローン Fab ドメインを有しているにもかかわらず、免疫グロブリン G (IgG) よりも効率的に SARS-CoV-2 を中和できることを報告した (2021)。本研究では、その機構を明らかにすることを目的としている。

まず各抗体とウイルスの結合力を ELISA で調べたところ、IgA および IgM は IgG よりも高いアビジニティでスパイクタンパクに結合していた。これは IgA と IgM が持つ複数の Fab がスパイクタンパクに結合した結果であると考えられる。

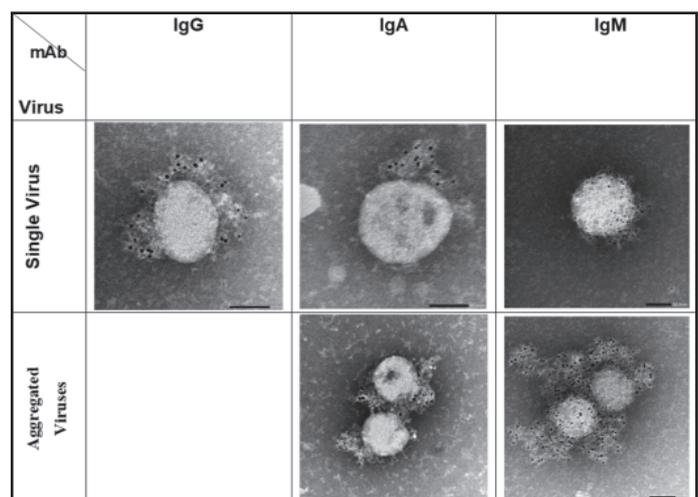


Fig. 2 Visualizing Antibody-Virus Interactions

さらに、スパイクタンパクが乏しい条件下でも IgA および IgM は IgG と比べてはるかに効率的にスパイクタンパクに結合した。これは、ウイルス粒子上でスパイクタンパクが不均一に分布しているにもかかわらず、IgA および IgM が効率的に機能する根拠となっている可能性がある。さらに電子顕微鏡での観察により、IgA および IgM は IgG とは対照的に、強力なウイルス凝集能力が確認できた (Fig.2)。この凝集は、総感染量を減少させる可能性がある。以上の結果により、IgA および IgM が IgG よりも効率的に中和を行っていると考えられる。

続いて、IgA および IgM は SARS-CoV-2 変異株に対しても IgG より広範に中和活性を示した。これを受けて我々は、変異株を以下の3つのグループに分類した。①すべての免疫グロブリン (クラス Igs) に感受性のあるもの、② IgG には耐性だが IgA/IgM には感受性のあるもの、③すべての免疫グロブリンに耐性のあるものである。我々は、IgA および IgM に対するウイルスの中和逃避機構を調べるために、ウイルスのエンベロープにアミノ酸変異を導入し解析を行った。三次元モデリングによると、S371L-S373P-S375F の置換は小さな立体構造の変化を引き起こし、Fab との結合を弱めることが示唆された。Fab が1つしかない IgG のほうが IgM や IgA と比べこの影響を受けやすいと考えられる。さらに別の変異である S371L-S373P-S375F の置換は大きな立体構造の変化を引き起こし、Fab への完全な耐性をもたらすことが明らかになった。これらの知見は、ウイルスの逃避機構を克服する上での IgA および IgM の重要性を強調するとともに、抗体医薬の開発に貢献できることを期待している。

We previously reported that anti-SARS-CoV-2 IgA and IgM can neutralize SARS-CoV-2 much more efficiently than IgG despite sharing identical 8A5 clone Fab domains (2021). This research focuses on clarifying the mechanisms of IgA and IgM.

IgA and IgM bound spike proteins with higher avidity than IgG judged by resistance to urea washing in ELISA, suggesting that multiple bindings between Fabs and spike proteins support the stable association. Moreover, they bound the spike proteins much more efficiently in conditions where spike proteins are scarce, probably the basis for their efficient functioning despite the uneven distribution of spike proteins on virus particles. In electron microscopy visualizations, IgA and IgM exhibited robust viral agglutination capabilities, in contrast to IgG. Aggregation could decrease the total infection amounts. Taken together, these observations account for more efficient neutralization of IgA and IgM than IgG

IgA and IgM neutralized the SARS-CoV-2 variants more broadly than the IgG. We classified variants into 3 groups, such as susceptible to all class Igs, resistant to IgG but susceptible to IgA/IgM, and resistant to all Igs. We performed mutational analyses to understand viral escape mechanisms against IgA and IgM. 3D modelling suggested that a small structural change by the S371L-S373P-S375F substitutions weakens binding, leading to unstable association of IgG, but still allows IgA/IgM with multiple bindings. The S371L-S373P-S375F substitutions cause a gross conformational change leading to complete resistance.

These findings also highlight the importance of IgA and IgM in overcoming viral escape mechanisms and provide insights for the development of antibody medicine.

List of Publications

Osama Hussein, Mohamed Mahgoub, Takafumi Shichijo, So Nakagawa, Junko Tanabe, Hirofumi Akari, Tomoyuki Miura, Masao Matsuoka, Jun-Ichirou Yasunaga. (2025). Evolution of primate T-cell leukemia virus type 1 accessory genes and functional divergence of its antisense proteins. PLoS Pathog.

List of Presentations

Yalcin Pisil, Hisatoshi Shida, Sandra Morales Ruiz, Kyunghak Cho, Metehan Gungor, Zafer Yazici , and Tomoyuki Miura. IgA and IgM superiority over IgG in neutralizing SARS-CoV-2 variants, The 71th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Aichi, November 05, 2024.

Yalcin Pisil, Hisatoshi Shida, Sandra Morales Ruiz, Kyunghak Cho, Metehan Gungor, Zafer Yazici , and Tomoyuki Miura. IgA and IgM superiority over IgG in neutralizing SARS-CoV-2 variants. The 4th Research Networking Salon, Kyoto, September 25-27, 2024.

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

技術室長補佐 宮地 均 Deputy Director, Technical Office Hitoshi Miyachi
技術係長 北野さつき Section Chief, Technical Office 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、体外受精によるマウスコロニーの拡大、胎生期解析用の受精卵作製なども行っている。詳細についてはホームページをご参照いただきたい。

<https://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/tgkoivf/> 2024 年の実績は下記の通りである。

1) 体外受精の依頼件数と胚の作製数

系統数：191 系統 作製胚数：23,136 個

2) 凍結胚チューブ作製本数

系統数：145 系統 作製チューブ本数：472 本

3) コロニー拡大などの胚の移植件数と移植胚数

系統数：165 系統 移植胚数：17,827 個

4) トランスジェニックマウスの作製

依頼件数：2 件 使用胚数：1,521 個

5) CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子編集マウスの作製

エレクトロポレーション 依頼件数：19 件 使用胚数：4,490 個

インジェクション 依頼件数：13 件 使用胚数：9,523 個

6) ES のインジェクション

ES 細胞のクローン数：14 クローン 使用胚数：1,972 個

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

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4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・動物福祉に十分な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、“時間と労力を減じる技術の採用や改良”を心掛けてきたが、近年、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50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 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 50 gene-manipulated mouse strains in this year.

List of Publications

- Ohara D, Takeuchi Y, **Hirota K**. Type 17 immunity: novel insights into intestinal homeostasis and autoimmune pathogenesis driven by gut-primed T cells. *Cell Mol Immunol*. 21:1183-1200. (2024)
- Yambe S, Yoshimoto Y, Ikeda K, Maki K, Takimoto A, Tokuyama A, Higuchi S, Yu X, Uchibe K, Miura S, **Watanabe H**, Sakuma T, Yamamoto T, Tanimoto K, **Kondoh G**, Kasahara M, Mizoguchi T, Docheva D, Adachi T, Shukunami C. Sclerostin modulates mineralization degree and stiffness profile in the fibrocartilaginous enthesis for mechanical tissue integrity. *Front Cell Dev Biol*. 2024 Jun 4;12:1360041. doi: 10.3389/fcell.2024.1360041. eCollection 2024.PMID: 38895158

Nakai R, Yokota T, Tokunaga M, Takaishi M, Yokomizo T, Sudo T, Shi H, Yasumizu Y, Okuzaki D, Kokubu C, Tanaka S, Takaoka K, Yamanishi A, Yoshida J, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Horie K, Hosen N, Sano S, Takeda J. A newly identified gene *Ahed* plays essential roles in murine haematopoiesis. *Nat Commun*. 2024 Jun 25;15 (1):5090. doi: 10.1038/s41467-024-49252-7.

Tani-Ichi S, Obwegs D, Yoshikawa A, **Watanabe H**, Kitano S, Ejima A, Hatano S, Miyachi H, Cui G, Shimba A, Abe S, Hori S, **Kondoh G**, Sagar, Yoshikai Y, Ikuta K. A RORE-dependent Intronic Enhancer in the IL-7 Receptor- α Locus Controls Glucose Metabolism via V γ 4+ γ δ T17 Cells. *J Immunol*. 2024 Aug 1;213 (3):283-295. doi: 10.4049/jimmunol.2300450.

Watanabe H, Ohara D, Chuma S, Takeuchi Y, Takano T, Katanaya A, Nakao S, Kaneko A, Oida T, Katsuno T, Uehata T, Takeo T, Okamoto M, **Hirota K**, **Kondoh G**. Ca²⁺-evoked sperm cessation determines embryo number in mammals. *bioRxiv* 2024.09.16.613169; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.09.16.613169>)

Yimiti D, Uchibe K, Toriyama M, Hayashi Y, Ikuta Y, Nakasa T, Akiyama H, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Takimoto A, Shukunami C, Adachi N, Miyaki S. CD1530, selective RAR γ agonist, facilitates Achilles tendon healing by modulating the healing environment including less chondrification in a mouse model. *J Orthop Res*. 2025 Feb;43 (2):273-284. doi: 10.1002/jor.26006. Epub 2024 Nov 8.

Miyazaki K, Horie K, **Watanabe H**, Hidaka R, Hayashi R, Hayatsu N, Fujiwara K, Kuwata R, Uehata T, Ochi Y, Takenaka M, Kawaguchi RK, Ikuta K, Takeuchi O, Ogawa S, Hozumi K, Holländer GA, **Kondoh G**, Akiyama T, Miyazaki M. A feedback amplifier circuit with Notch and E2A orchestrates T-cell fate and suppresses the innate lymphoid cell lineages during thymic ontogeny. *Genes Dev*. 2025 Mar 3;39 (5-6):384-400. doi: 10.1101/gad.352111.124.

Yu X, Kawakami R, Yambe S, Yoshimoto Y, Sasaki T, Higuchi S, **Watanabe H**, Akiyama H, Miura S, Hu K, **Kondoh G**, Sagasaki R, Inui M, Adachi T, Docheva D, Imamura T, Shukunami C. Dynamic interactions between cartilaginous and tendinous/ligamentous primordia during musculoskeletal integration. *Development*. 2025 Mar 15;152 (6):dev204512. doi: 10.1242/dev.204512. Epub 2025 Mar 26.

List of Presentations

Luca D, Lee S, **Hirota K**, Okabe Y, Uehori J, Izawa K, Lanz L, Schütte V, Sivri B, Tsukamoto Y, Hauck F, Behrend R, Roers A, Fujita T, Nishikomori R, Lee-Kirsch M, Kato H. Dysregulation of Treg homeostasis by ADAR1 deficiency and chronic MDA5 signaling. The 7th TOLL Conference, Rotterdam, Netherlands, 2024 年 04 月 18 日

Hirota K. Multi-organ Inflammation Driven by Autoimmune Single TCR-bearing T Cells. Immunology symposium at The Francis Crick Institute, London, UK, 2024 年 10 月 11 日

- Ohara D, Takeuchi Y, **Watanabe H**, Lee Y, Mukoyama H, Ohteki T, **Kondoh G**, **Hirota H**. Novel IL-23 reporter mice reveals the cellular and molecular regulation of IL-23 production in mucosal host defense. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日
- Takeuchi T Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. A three-stage differentiation pathway for highly arthritogenic CD103- CD200+ Th17 cells. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日
- Mukoyama H, Takeuchi Y, Ohara D, Lee Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Differentiation and activation of monocytes/macrophages induced by GM-CSF signaling exacerbates synovial inflammation in autoimmune arthritis. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日
- Lee Y, Ohara D, Mukoyama H, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**. Keratinocytes rather than antigen presenting cells are critical source of IL-23 in psoriasiform dermatitis. Cytokines 2024, 12th Annual Meeting of the International Cytokines & Interferon Society, Korea, 2024 年 10 月 20 日
- Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Expression of CD103 and CD200 define functionally distinct arthritogenic Th17 cells. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日
- Mukoyama H, Takeuchi Y, Ohara D, Lee Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. GM-CSF-dependent Macrophage Subpopulation Derived from Ly6Chi Monocytes Causes Development and Enhancement of Joint Inflammation in Autoimmune Arthritis. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日
- Yasuda K, Aoki J, Tanaka K, Ohara D, **Hirota K**, Takeuchi O. Regnase-4 protects mice against HSV-1 infection by reinforcing type I interferon production. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日
- Ohara D, Takeuchi Y, Lee Y, Mukoyama H, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**. Neutrophil-derived IL-23 p19 monomer suppresses type 17 immunity. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日
- Lee Y, Ohara D, Mukoyama H, Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, **Hirota K**. IL-23 secretion by keratinocytes rather than antigen presenting cells play critical role in the pathogenesis of psoriasiform dermatitis. The 53rd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Nagasaki, Japan, 2024 年 12 月 04 日
- Takeuchi Y, Ohara D, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Morinobu A, **Hirota K**. Heterogeneity and molecular basis of arthritogenic Th17 cells in inflamed joints. Keystone Symposia: T Cell Differentiation in Tissue Microenvironments, Vancouver, Canada, 2025 年 02 月 05 日

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

臨床基盤分野

Division of Clinical Bases for ES Cell Research

准教授	川瀬栄八郎	Assoc. Prof.	Eihachiro Kawase
特定助教	高田 圭	Project Asst. Prof.	Kei Takada

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基盤技術の開発・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ッシング施設を有し、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。最近では海外からのヒト ES 細胞の分配リクエストもくるようになった。

また、私達はヒト多能性幹細胞の培養に使われる市販の培地のほとんどが FGF2 を含むことに着目し、低分子化合物での代替とその作用機構の解明に関する研究を進め成果をまとめ、現在論文投稿中である。

2) 細胞プロセッ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。

Cell Processing Facility for clinical-grade human ES cells



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
KthES19	2023.12.26	46,XX
KthES20	2023.12.26	46,XX
KthES21	2025.1.20	46,XX

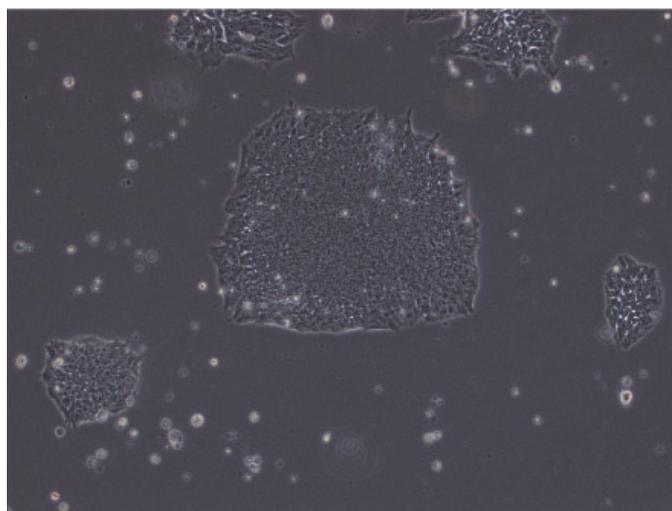


表 (左) List of clinical-grade hESC lines established at the Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University.

図 (右) Phase contrast microcopy of clinical-grade KthES11 cells.

この施設を用いて2017年6月より臨床用ES細胞の樹立を開始し、2018年5月には初めての臨床用ヒトES細胞株の樹立報告書を文部科学大臣、厚生労働大臣提出し、受理された。2025年3月までに10株の臨床用ヒトES細胞の作製、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。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。

Human embryonic stem (ES) cell lines have great potential in medical research and applications, such as cell transplantation therapy and drug discovery. We established human ES cell lines efficiently and analyzed their characteristics in detail. The human ES cell lines have been distributed to over 50 research projects in Japan. Recently, we have been receiving occasional requests for cell distribution from overseas. We are also researching the molecular mechanisms of self-renewal and differentiation in human ES cells and developing techniques for genetic manipulation. Additionally, we operate a Cell Processing Facility (CPF) to develop core technologies, generating and supplying clinical-grade human ES cell lines. We have established standard operating procedures to produce clinical-grade human ES cell lines and established a clinical-grade human ES cell bank, aiming to supply these cells to researchers in regenerative medicine.

1) Establishment and analysis of human ES cell lines for clinical application

ES 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 the establishment of 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.

Furthermore, we have noticed that most commercially available media used in the culture of human pluripotent stem cells contain FGF2, and have been conducting research into replacing it with small compounds and elucidating their mechanism of action.

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

Several issues remain for the clinical application of human ES cells, such as developing a chemically 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 members of the ISCBi (International Stem Cell Biobanking 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 initiated the derivation of clinical-grade human ES cell lines after obtaining governmental approval for the project. We reported the derivation of the first clinical-grade human ES cell line, KthES11, in May 2018, and 10 cell lines by January 2025. Frozen stocks of these cell lines are ready for distribution to research institutes aiming for clinical application of human ES cells.

List of Publications

Morikawa, K., Nagasaki, A., Sun, L., Kawase, E., Ebihara, T., and Shirayoshi, Y. (2024) Optogenetic control

of early embryo labeling using photoactivatable Cre recombinase 3.0. FEBS Open Bio. 14, 1888-1898.

List of Presentations

山崎 - 藤垣 静香, 中谷 良子, 藤井 麻衣, 末盛博文, 川瀬栄八郎 ヒト多能性幹細胞における新規低分子化合物 NN15-017 の効果 第 24 回日本再生医療学会総会、横浜、2025 年 3 月 20-22 日

高田圭、山崎 - 藤垣 静香、藤井 麻衣、川瀬 栄八郎：CPC 外クリーンルームにおけるヒト ES 細胞培養の品質管理の試み 第 24 回日本再生医療学会総会、横浜、2025 年 3 月 20-22 日

木ト 貴之、伊倉 宏一、遠井 紀江、大釜 里央、小笠原 裕之、千田 尚人、高田 圭、川瀬 栄八郎、中辻 憲夫：臨床用多能性幹細胞由来シュワン細胞の製造法開発と神経損傷治療に向けての特性評価 第 24 回日本再生医療学会総会、横浜、2025 年 3 月 20-22 日

共同研究

ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点

2024 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2024 年 4 月～2025 年 3 月）

①ウイルス感染研究

ウイルス感染研究として計 8 件の研究を行った。

【世界的に流行する懸念がある SARS-CoV-2 変異株の早期捕捉とその性状解明】

○研究代表者：東京大学医科学研究所 教授 佐藤 佳

○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：

公共データベースに登録されたウイルス配列情報を基に、世界で流行する変異株をバイオインフォマティクス解析し、変異株の出現をモニタリングした。その結果をもとに、変異株のスパイクタンパク質発現プラスミドおよびシュードウイルスを作製し、ウイルス学実験により変異株の性状解明した。更に、発現精製したスパイクタンパク質の構造解析に成功し、変異株研究の迅速な連携を実現した。特に本年度は、SARS-CoV-2 の新興変異株である EG.5.1, BA.2.86, JN.1 について、ウイルスの感染性や免疫逃避メカニズムの理解を深めた。

【SARS-CoV-2 変異ウイルス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 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：

中和抗体による COVID-19 治療は臨床症状の改善に一定の貢献を果たした。本研究では、抗体 NT-108 の治療効果をハムスターモデルで確認し、低用量でも防御効果があることを示した。さらに、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質との複合体の構造をクライオ電子顕微鏡による構造解析によって解明し、NT-108 の中和メカニズムを構造的・機能的に明らかにした。これにより、変異株が免疫から逃れる仕組みも判明し、治療抗体の合理的設計に貢献する知見が得られた。

【特定の細胞でのみ複製するエピソード RNA ウイルスベクターの開発】

○研究代表者：岡山大学学術研究院医歯薬学域 教授 本田 知之

○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

【パラミクソウイルスゲノム複製における Rule of Six 存在意義の証明】

○研究代表者：鹿児島大学共同獣医学部・越境性動物疾病制御研究センター
准教授 松本 祐介

○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

【B型肝炎ウイルス感染制御に関する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：微細構造ウイルス学分野 教授 野田 岳志

○研究成果：

① HBV が感染しない旧世界ザルの NTCP とヒト NTCP の構造比較から、HBV 感染に厳密な種特異性が生じる要因を構造学的観点から解明した (Nature Commun., 2024)。

② コロナウイルス感染症の経口治療薬シーズ化合物を見出し、作用標的が SARS-CoV-2 の膜蛋白質 M protein であることを特定した。当該化合物の作用機序を構造学的に明らかにした (Nature, 2025)。

【ボルナ病ウイルス 1 の N タンパク質-RNA 複合体の形成機構の解析】

○研究代表者：大阪公立大学大学院獣医学研究科 教授 堀江 真行

○医生物学研究所共同研究者：微細構造ウイルス学分野 教授 野田 岳志

○研究成果：

これまでの研究において明らかにした BoDV-1 の N-RNA 複合体の構造をもとに、N タンパク質の RNA 結合部位をアラニンに置換した変異体が大腸菌にて発現・精製し、クライオ電子顕微鏡解析を行った。その結果、野生型 N タンパク質で見られたようなリング状の多量体が観察され、N タンパク質が RNA 結合前に多量体を形成し、N-RNA 複合体の基本骨格を組むという形成モデルを提唱した。

【In Situ Structural Analysis of the Ebola and Marburg Virus Nucleocapsid】

○研究代表者：Max Planck Institute of Biochemistry Postdoc Yoko Fujita-Fujiharu

○医生物学研究所共同研究者：微細構造ウイルス学分野 教授 野田 岳志

○研究成果：

本年度は、エボラウイルス様粒子内のヌクレオカプシド構造をクライオ電子顕微鏡による単粒子解析で解明し、VP24 が核タンパク質-RNA 複合体に異なる 2 つの様式で結合し、ウイルス増殖を制御する分子スイッチとして機能することを構造・機能両面から実証した。本成果は Nature Communications 誌に掲載された。

【CRISPR スクリーニングを用いた HIV キャプシドによる抗ウイルス応答制御の網羅的解析】

○研究代表者：国立国際医療研究センター研究所 ウイルス構造機能研究部 テニユアトラック部長 町田 晋一

○医生物学研究所共同研究者：幹細胞遺伝学分野 助教 西淵 剛平

○研究成果：

まず、CRISPR スクリーニングによる網羅的解析を行うためのレポーターアッセイ系の構築を行った。GFP を融合した HIV-1 と HIV-2 型の点変異を導入したものをそれぞれ感染させ、その感染効率を比較し、点変異による感染効率の低下を確認することができた。また、点変異を導入した

キャプシドの構造を解くことに成功したが (2.65 Å)、点変異ではなく HIV-2 のキャプシドを利用する方が適切であることが判明したため、実験系の再構築を行なっている。

②幹細胞・組織再生研究

幹細胞・組織再生研究として計 8 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

[造血幹細胞ニッチの変容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 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：

我々は、筋肉、肺、大腸に存在する普遍的線維芽細胞について、CD248 を特異的に発現すること、皮下に移植すると異所性に骨と骨髄が形成され、その中で、骨髄 CAR 細胞（造血幹細胞のニッチ細胞）の遺伝子発現特性と造血幹細胞維持能を持つ細胞に分化することを示した。また、これらの線維芽細胞を骨髄内に注入しても同様の細胞に分化した。これより、CAR 細胞に分化できる普遍的線維芽細胞が様々な組織に存在することが明らかになり、線維芽細胞系列の細胞に階層性が存在することが初めて実証された。今後、分化の分子機構を解明することで、試験管内人工骨髄の開発や骨軟骨修復などの再生医療の基盤となる可能性がある。

[リンパ行性薬物送達法を用いた転移リンパ節に対する新たな免疫原性化学療法の開発]

- 研究代表者：東北大学大学院医工学研究科 教授 小玉 哲也
- 医生物学研究所共同研究者：病因免疫学分野 教授 伊藤 能永

[腫瘍組織と正常組織の自然選択の違いに基づいた新規治療標的の探索]

- 研究代表者：京都大学白眉センター 特定准教授 垣内 伸之
- 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

[Genetic analysis of the formative pluripotency]

- 研究代表者：University of Nottingham Assistant Professor Masaki Kinoshita
- 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

[特定の α - ケト酸選択的な新規化学蛍光プローブの開発]

- 研究代表者：京都大学大学院薬学研究科 助教 南條 毅
- 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

【小胞体—ミトコンドリア間接触がマウス成体神経幹細胞の分化運命制御に果たす役割】

○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

○研究成果：

小胞体—ミトコンドリア繫留因子であり、PTSDの原因遺伝子の重要な候補である PDZD8 のニューロン新生における役割の解明を行った。また、休眠期と活性化状態の神経幹細胞の基本的性質を明らかにするために、それぞれ状態にある培養神経幹細胞を電顕用にサンプリングし、解析を進めている。また、電子顕微鏡解析に有用な APEX2 発現マウスの共同開発を行った。

【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

③生命システム研究

生命システム研究として計 18 件の研究を行った。

【Ultrastructural pathology for airway defense mechanism】

○研究代表者：University of Cambridge - MRC Toxicology Unit

Head of Electron Microscopy and Ultrastructural Pathology Nobuhiro Morone

○医生物学研究所共同研究者：微細構造ウイルス学分野 教授 野田 岳志

【濾胞性ヘルパー T 細胞の長期生存を支える分子機構の解明】

○研究代表者：大阪大学感染症総合教育研究拠点 教授 伊勢 渉

○医生物学研究所共同研究者：再生免疫学分野 准教授 宮崎 正輝

【タイトジャンクション構成タンパク質の液-液相分離による上皮バリア制御】

○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

【母子間における時間秩序統合原理の解明】

○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：

これまでの我々の一連の研究から明らかになった母子同調成立時期に大きく発現が変化する遺伝子をノックアウトし、ターゲット遺伝子を欠損しているマウスを複数ライン作製した。これまでの研究から予測される遺伝子の欠損による表現型も現れており、目的とするノックアウトマウスの樹立が確実となっている。系統の保存とともに遺伝子発現の時系列解析を行うための予備実験と匹

数確保を行った。発生初期と後期における胎児をサンプリングし、RNA-seq 解析を実施した。現在、どのような遺伝子に発現変化が起きているのか解析を行なっているところである。

【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：

今年度、Th1 型 Treg に選択的に発現するクロノタイプの解析を進め、Th1 型 Treg に選択的に分化することを確認した。TCR クロノタイプ依存的な Th1 型 Treg 分化機構として cDC1 に着目し、cDC1 欠損マウスで分化が障害され、cDC1 依存的に分化を誘導する TCR クロノタイプが存在することを示した。また、注目する 2 種類の TCR クロノタイプのトランスジェニックマウス作製を進め、ファウンダーマウスを得た。

【免疫寛容誘導型 mRNA ワクチンの開発】

- 研究代表者：東京科学大学総合研究院難治疾患研究所 教授 内田 智士
- 医生物学研究所共同研究者：病因免疫学分野 教授 伊藤 能永
- 研究成果：

mRNA の純度と、生体内投与後のタンパク質発現量、自然免疫応答の関係を調べた。投与系として、ワクチンで有望な脂質性ナノ粒子の筋肉内投与及び mRNA 単体の皮内へのジェット投与を検討した。レポーター mRNA を用いた試験で、いずれの投与系でも、mRNA の純度向上により、マウス体内でのレポータータンパク質発現効率が増大し、自然免疫応答が軽減された。高純度な mRNA が免疫寛容誘導ワクチンの有力な構成要素となることが明らかとなった。

【線維軟骨性エンターシスにおける形態形成のメカノシグナル関連機構の解明】

- 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
- 研究成果：

線維軟骨性エンターシスは、Scx⁺/Sox9⁺ 前駆細胞に由来する硝子軟骨と腱の二層構造を経て、成長に伴い四層構造を形成する。本研究では、Scx 欠失マウスを用い、Sox9 陽性細胞の減少、Gli1 陽性細胞の散在、石灰化領域の減少、Sclerostin や Col10 の発現変化を示した。細胞分化と組織変形を統合した数理モデルで UFC/CFC 分布と形成過程を in silico で再現した。

【ヒト ES 細胞を用いた上衣腫モデルの構築とその応用】

- 研究代表者：名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所 教授 川内 大輔
- 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

【クライオ電子顕微鏡と *in vivo* 光架橋実験による膜内切断プロテアーゼと基質の結合様式の解明】

○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：

超好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来 RseP オルソログ (*AaRseP*) およびその活性変異体のクライオ電顕解析を行ったところ、活性中心近傍にリガンドが結合していることが明らかになった。質量分析や受入教員らと共同で行った生化学的解析から、大腸菌由来の膜タンパク質断片が結合していることが判明し、細胞膜上の *AaRseP* も同様の結合様式で基質と相互作用することが確かめられた。

【構造理論と蛍光イメージング、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：京大生命科学研究科 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。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。これらの結果はプレプリントサーバーにデポジットし (Yamauchi, bioRxiv, 2025)、現在論文投稿中である。

【Genome-wide screening of factors affecting survivals of BRCA2- and PALB2-defective cancer】

○研究代表者：Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford Professor Fumiko Esashi

○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

【CRISPR スクリーニングを用いたヒトトロトロンスポゾンの転移制御因子の探索に関する研究】

○研究代表者：理化学研究所生命医科学研究センター チームリーダー 三好 知一郎

○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

【新規 L1 トランスポゾン制御因子の同定と分子機構の解明】

○研究代表者：理化学研究所開拓研究本部 主任研究員 眞貝 洋一

○医生物学研究所共同研究者：幹細胞遺伝学分野 助教 西淵 剛平

○研究成果：

CRISPR 技術とビオチンの近位標識技術を組み合わせたプロテオミクス手法により、H3K9 メチルが無い細胞においてもヘテロクロマチン領域に結合している因子の解析を行なった。その結果、これまでヘテロクロマチンにおける機能について十分に解析されていない複数の候補因子を同定することができた。これらの候補因子の機能解析を完遂することはできなかったが、今後、本研究課題の内容について引き続き共同研究を行なう予定である。

【膵臓がんの発生におけるアミノ酸レベルとタンパク質翻訳の解析】

○研究代表者：名古屋大学大学院理学研究科 教授 松本 有樹修

○医生物学研究所共同研究者：がん・幹細胞シグナル分野 准教授 服部 鮎奈

○研究成果：

Ribosome heterogeneity とは、細胞内や異なる細胞型間などで異なる特化したリボソームのことであり、特にがんの促進などに寄与するものはオンコリボソームと呼ばれる。今回我々は、膵臓がんをモデルとして翻訳動態の変動を見だし、さらに Sel-TCP-MS 法を用いてオンコリボソームを規定する可能性のある候補因子を同定した。今後それら知見を基にした治療の可能性について検討していく。

【長期記憶の時間的遷移に伴う責任大脳領域変化および分子機構の解明】

○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

○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

○研究成果：

これまで長期記憶（近時記憶）は海馬が、また、永続的記憶（遠隔記憶）は大脳皮質が責任領域であると考えられていた（Standard Consolidation Theory）。我々は、さらに海馬非依存的な記憶である遠隔記憶は想起されることにより再び海馬依存的になることを明らかにし、海馬依存性は動的に変化することを示した。また本共同研究で開発した2時点2色標識法を用いて海馬内で近時記憶と遠隔記憶に関わる細胞集団は異なることを明らかにした。これらは論文にまとめ、投稿に向けて最終化段階である。

【組織形成における生体秩序力学の網羅的解析】

○研究代表者：理化学研究所開拓研究本部 基礎科学特別研究員 塩見 晃史

○医生物学研究所共同研究者：ナノ生物学分野 教授 新宅 博文

○研究成果：

本年度は、1細胞レベルでの細胞表面張力と遺伝子発現を統合的に解析可能とする新規手法「ELASTomics」の測定対象を1細胞から多細胞系へと拡張し、MDCK細胞から形成される単層オルガノイドにおける細胞競合によるがん化細胞が排除過程において、力学特性の継時変化を可視化することに成功した。また、UCLAのDino Di Carlo教授との共同研究により、細胞変形能と遺伝子発現を統合解析する新たな手法として「MECHANOmics」を開発した。

【血管新生の多細胞の協調機序に迫る再構成血管モデルの分析手法の開発】

○研究代表者：東京科学大学総合研究院生体材料工学研究所 准教授 梨本 裕司

○医生物学研究所共同研究者：ナノ生物学分野 教授 新宅 博文

[Profiling Dormant Cancer Cells through Mechanical and Transcriptomic Analysis]

○研究代表者： Assiut University Assistant Professor Mahmoud Nady Abdelmoez Atta

○医生物学研究所共同研究者： ナノ生物工学分野 教授 新宅 博文

○研究成果：

単一のがん細胞を異なる硬さ (0.2, 1.0, 3.2 kPa) のハイドロゲルビーズに封入し、力学的拘束下で培養した。

培養中、細胞は「増殖」「非増殖」「死滅」の3つの表現型に分かれた。

硬いゲル (≥ 1.0 kPa) では、初回分裂後に細胞周期が停止し、非増殖 (休眠) 状態への移行が見られた。

フローサイトメトリーにより、非増殖集団は G1 後期で細胞周期が停止しており、4 日目以降に集団が均衡状態に達した。

MKI67 の発現低下、CDKN1A および SOX9 の発現上昇が時間とともに観察された。

RNA シーケンスにより、 β カテニン経路の抑制が確認された。

2024 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
東京大学医科学研究所 佐藤 佳 教授	ウイルス制御分野 橋口 隆生 教授	世界的に流行する懸念がある SARS-CoV-2 変異株の早期捕捉とその性状解明
北海道大学大学院薬学研究院 前仲 勝実 教授	ウイルス制御分野 橋口 隆生 教授	SARS-CoV-2 変異ウイルスを制御する中和抗体開発に向けた分子基盤の解明
岡山大学学術研究院医歯薬学域 本田 知之 教授	RNA ウイルス分野 朝長 啓造 教授	特定の細胞でのみ複製するエビゾーマル RNA ウイルスペクターの開発
鹿児島大学共同獣医学部・越境性動物疾病制御研究センター 松本 祐介 准教授	RNA ウイルス分野 朝長 啓造 教授	パラミクソウイルスゲノム複製における Rule of Six 存在意義の証明
京都大学大学院医学研究科 野村 紀通 准教授	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	B 型肝炎ウイルス感染制御に関するクライオ電子顕微鏡構造研究
大阪公立大学大学院獣医学研究科 堀江 真行 教授	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	ボルナ病ウイルス 1 の N タンパク質 -RNA 複合体の形成機構の解析
Max Planck Institute of Biochemistry Postdoc Yoko Fujita-Fujiharu	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	<i>In Situ</i> Structural Analysis of the Ebola and Marburg Virus Nucleocapsid
国立国際医療研究センター研究所ウイルス構造機能研究部 町田 晋一 テニユアトラック部長	幹細胞遺伝学分野 西淵 剛平 助教	CRISPR スクリーニングを用いた HIV キャプシドによる抗ウイルス応答制御の網羅的解析

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
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を制御する分子機構の解明
東北大学医工学研究科 小玉 哲也 教授	病因免疫学分野 伊藤 能永 教授	リンパ行性薬物送達法を用いた転移リンパ節に対する新たな免疫原性化学療法の開発
京都大学白眉センター 垣内 伸之 特定准教授	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	腫瘍組織と正常組織の自然選択の違いに基づいた新規治療標的の探索
University of Nottingham Assistant Professor Masaki Kinoshita	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	Genetic analysis of the formative pluripotency
京都大学大学院薬学研究科 南條 毅 助教	がん・幹細胞シグナル分野 伊藤 貴浩 教授	特定の α -ケト酸選択的な新規化学蛍光プローブの開発
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	小胞体—ミトコンドリア間接触がマウス成体神経幹細胞の分化運命制御に果たす役割
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

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
University of Cambridge - MRC Toxicology Unit Head of Electron Microscopy and Ultrastructural Pathology Nobuhiro Morone	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	Ultrastructural pathology for airway defense mechanism
大阪大学感染症総合教育研究拠点 伊勢 渉 教授	再生免疫学分野 宮崎 正輝 准教授	濾胞性ヘルパー T 細胞の長期生存を支える 分子機構の解明
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	タイトジャンクション構成タンパク質の 液-液相分離による上皮バリア制御
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	母子間における時間秩序統合原理の解明
東京大学大学院薬学系研究科 堀 昌平 教授	統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授	制御性 T 細胞の不均一性形成メカニズム の解明
東京科学大学総合研究院難治疾患研究所 内田 智士 教授	病因免疫学分野 伊藤 能永 教授	免疫寛容誘導型 mRNA ワクチンの開発
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	線維軟骨性エンテシスにおける形態形成 のメカノ-シグナル連関機構の解明
名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経 科学研究科 川内 大輔 教授	発生システム制御分野 永樂 元次 教授	ヒト ES 細胞を用いた上衣腫モデルの構築 とその応用
横浜市立大学大学院生命医科学研究科 禾 晃和 准教授	生体膜システム分野 秋山 芳展 教授	クライオ電子顕微鏡と <i>in vivo</i> 光架橋実験 による膜内切断プロテアーゼと基質の結 合様式の解明
京都大学生命科学研究科 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、光遺伝学を 用いた細胞周期ネットワークの統合的理解
Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford Professor Fumiko Esashi	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	Genome-wide screening of factors affecting survivals of BRCA2- and PALB2-defective cancer
理化学研究所 生命医科学研究センター 三好 知一郎 チームリーダー	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	CRISPR スクリーニングを用いたヒトレト ロトランスポゾン転移制御因子の探索 に関する研究
理化学研究所開拓研究本部 眞貝 洋一 主任研究員	幹細胞遺伝学分野 西淵 剛平 助教	新規 L1 トランスポゾン制御因子の同定と 分子機構の解明
名古屋大学大学院理学研究科 松本 有樹修 教授	がん・幹細胞シグナル分野 服部 鮎奈 准教授	膵臓がんの発生におけるアミノ酸レベル とタンパク質翻訳の解析
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	長期記憶の時間的遷移に伴う責任大脳領 域変化および分子機構の解明
理化学研究所開拓研究本部 塩見 晃史 基礎科学特別研究員	ナノ生物工学分野 新宅 博文 教授	組織形成における生体秩序力学の網羅的 解析
東京科学大学総合研究院生体材料工学 研究所 梨本 裕司 准教授	ナノ生物工学分野 新宅 博文 教授	血管新生の多細胞の協調機序に迫る再構 成血管モデルの解析手法の開発
Assiut University Assistant Professor Mahmoud Nady Abdelmoez Atta	ナノ生物工学分野 新宅 博文 教授	Profiling Dormant Cancer Cells through Mechanical and Transcriptomic Analysis

学術集会

京都大学医生物学研究所
「ウイルス・幹細胞システム医生物学共同研究拠点」
令和6年度キックオフミーティング

開催日：2024年5月21日（火）

開催方法：医生物学研究所1号館1階会議室／ZOOM

開会挨拶

所長 河本 宏（医生物学研究所）

「B型肝炎ウイルス感染制御に関するクライオ電子顕微鏡構造研究」

野村 紀通 准教授（京都大学大学院医学研究科）

「世界的に流行する懸念がある SARS-CoV-2 変異株の早期捕捉とその性状解明」

佐藤 佳 教授（東京大学医科学研究所）

「SARS-CoV-2 変異ウイルスを制御する中和抗体開発に向けた分子基盤の解明」

前仲 勝実 教授（北海道大学大学院薬学研究院）

「特定の細胞でのみ複製するエピゾーマル RNA ウイルスベクターの開発」

本田 知之 教授（岡山大学学術研究院医歯薬学域）

「パラミクソウイルスゲノム複製における Rule of Six 存在意義の証明」

松本 祐介 准教授（鹿児島大学共同獣医学部・越境性動物疾病制御研究センター）

「クライオ電子顕微鏡と *in vivo* 光架橋実験による膜内切断プロテアーゼと基質の結合様式の解明」

禾 晃和 准教授（横浜市立大学大学院生命医科学研究科）

「血管新生の多細胞の協調機序に迫る再構成血管モデルの分析手法の開発」

梨本 裕司 准教授（東京医科歯科大学生体材料工学研究所）

「濾胞性ヘルパー T 細胞の長期生存を支える分子機構の解明」

伊勢 渉 教授（大阪大学感染症総合教育研究拠点）

「CRISPR スクリーニングを用いたヒトレトロトランスポソンの転移制御因子の探索に関する研究」

三好 知一郎 チームリーダー（国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センター）

「新規 L1 トランスポソン制御因子の同定と分子機構の解明」

眞貝 洋一 主任研究員（理化学研究所開拓研究本部）

「免疫寛容誘導型 mRNA ワクチンの開発」

内田 智士 教授（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

「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（滋賀医科大学学生化学・分子生物学講座（分子生理化学部門））

「ヒト ES 細胞を用いた上衣腫モデルの構築とその応用」

川内 大輔 教授（名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経科学研究所 腫瘍・神経生物学分野）

「特定の α -ケト酸選択的な新規化学蛍光プローブの開発」

南條 毅 助教（京都大学大学院薬学研究所）

「小胞体-ミトコンドリア間接触がマウス成体神経幹細胞の分化運命制御に果たす役割」

平林 祐介 准教授（東京大学大学院工学系研究科）

「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」

竹内 理 教授（京都大学大学院医学研究科）

「膝臓がんの発生におけるアミノ酸レベルとタンパク質翻訳の解析」

松本 有樹修 教授（名古屋大学大学院理学研究科）

「長期記憶の時間的遷移に伴う責任大脳領域変化および分子機構の解明」

奥野 浩行 教授（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

「線維軟骨性エンテシスにおける形態形成のメカノ-シグナル連関機構の解明」

宿南 知佐（発表者：広島大学大学院医系科学研究科准教授 三浦重徳） 教授（広島大学大学院医系科学研究科）

「構造理論と蛍光イメージング、光遺伝学を用いた細胞周期ネットワークの統合的理解」

青木 一洋 教授（京大学生命科学研究科）

「リンパ行性薬物送達法を用いた転移リンパ節に対する新たな免疫原性化学療法の開発」

小玉 哲也 教授（東北大学医工学研究科）

「造血幹細胞ニッチの変容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）

「母子間における時間秩序統合原理の解明」

八木田 和弘（発表者：京都府立医科大学講師 梅村康浩）教授（京都府立医科大学大学院医学研究科）

「制御性 T 細胞の不均一性形成メカニズムの解明」

堀 昌平（発表者：東京大学大学院薬学系研究科 免疫・微生物学教室助教 村上龍一）教授（東京大学大学院薬学系研究科）

「タイトジャンクション構成タンパク質の液-液相分離による上皮バリア制御」

月田 早智子 教授（帝京大学先端総合研究機構）

「組織形成における生体秩序力学の網羅的解析」

塩見 晃史 基礎科学特別研究員（理化学研究所開拓研究本部）

「Profiling Dormant Cancer Cells through Mechanical and Transcriptomic Analysis」

Mahmoud Nady Abdelmoez Atta Assistant Professor (Assiut University)

「CRISPR スクリーニングを用いた HIV キャプシドによる抗ウイルス応答制御の網羅的解析」

町田 晋一 テニュアトラック部長（国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所 ウイルス構造機能研究部）

「ボルナ病ウイルス 1 の N タンパク質-RNA 複合体の形成機構の解析」

堀江 真行 教授（大阪公立大学獣医学研究科）

「*In Situ* Structural Analysis of the Ebola and Marburg Virus Nucleocapsid」

Yoko Fujita-Fujiharu Postdoc (Max Planck Institute of Biochemistry (マックスプランク生化学研究所))

「Ultrastructural pathology for airway defense mechanism」

Nobuhiro Morone Head of Electron Microscopy and Ultrastructural Pathology (University of Cambridge - MRC Toxicology Unit, UK)

「Genome-wide screening of factors affecting survivals of BRCA2- and PALB2-defective cancer」

Fumiko Esashi Professor (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford)

「Genetic analysis of the formative pluripotency」

Masaki Kinoshita Assistant Professor (University of Nottingham)

「腫瘍組織と正常組織の自然選択の違いに基づいた新規治療標的の探索」

垣内 伸之 特定准教授（京都大学白眉センター）

閉会挨拶

朝長 啓造（医生物学研究所 副所長）

医生物学研究所 第 18 回公開講演会

開催日：2024 年 7 月 20 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

河本 宏（医生物学研究所 所長）

「電気力で細胞を操作する」

新宅 博文（医生物学研究所 教授）

「生命を解き明かし、未来医療をつくるウイルス研究」

朝長 啓造（医生物学研究所 教授）

閉会挨拶

河本 宏（医生物学研究所 所長）

医生物学研究所「神経科学」研究会

開催日：2024 年 7 月 9 日（火）

開催方法：京都大学芝蘭会館 稲盛ホール

開会挨拶

永樂 元次（医生物学研究所 教授）

「パーキンソン病の病態はどこまでわかったかープリオン仮説を中心にー」
「BioID 法を応用した空間プロテオーム技術で探るシナプスの多様性」
「GPCR の多様な機能：嗅覚受容体の新しいシグナル機構」
「海馬台における情報表現と神経多様体」
「霊長類の大脳皮質を対象とした光学計測・光遺伝学技術の開発と応用」

山門 穂高（京都大学）
高野 哲也（九州大学）
中嶋 藍（東京大学）
水関 健司（大阪公立大学）
蝦名 鉄平（東京大学）

閉会挨拶

河本 宏（医生物学研究所 所長）

医生物学研究所「物理学・情報科学と生物学」研究会

開催日：2024年7月31日（水）
開催方法：京都大学芝蘭会館 山内ホール

閉会挨拶

河本 宏（医生物学研究所 所長）

「RNA 構造解析／比較ゲノム解析による機能未知遺伝子の機能推定」
「変異情報に基づく初期発生の系譜再構築と細胞運命の非対称性の解析」
「細胞サイズスケールにおける空間サイズ依存的な相分離と分子拡散」
「細胞内凝集体の共存原理：ヘテロポリマー間相互作用の理論予測から」
「化学反応ネットワーク上の最適輸送と熱力学」

福永 津嵩（早稲田大学）
松本 拡高（長崎大学）
柳澤 実穂（東京大学）（オンライン）
川口 喬吾（理化学研究所）
伊藤 創祐（東京大学）

閉会挨拶

望月 敦史（医生物学研究所 教授）

医生物学研究所「感染現象と医学・生命科学」研究会

開催日：2025年1月27日（月）
開催方法：京都大学芝蘭会館 稲盛ホール

閉会挨拶

野田 岳志（医生物学研究所 教授）

「ヘルペスウイルスによる宿主細胞の「改変」」
「ムンプスウイルスの RNA 合成機構の解明に向けたウイルス-宿主相互作用解析」
「RNA ウイルスと宿主の相互作用」
「単純ヘルペスウイルス研究から紐解く医学・生命科学」
「人獣共通感染症対策に資する野外調査研究と抗ウイルス薬研究」

有井 潤（神戸大学）
加藤 大志（東京大学）
牧野 晶子（京都大学）
加藤 哲久（東京大学）
佐々木 道仁（北海道大学）

閉会挨拶

河本 宏（医生物学研究所 所長）

分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演 題	主催分野
2024. 4.12	眞貝 洋一 (理化学研究所)	Biology of histidine methylation	幹細胞遺伝学
2024. 6. 4	三井 優輔 (京都大学医生物学研究所 発生システム制御分野・助教)	Wnt is essential for self-organization of planar cell polarity (PCP) not via its global gradient but via local molecular interactions with core PCP components	数理生物学
2024. 6. 7	Yonggui Gao (School of Biological Sciences, Nanyang Technological University, Singapore)	Structural basis of the SPFH protein complexes with cage assembly	生体膜システム
2024. 6.26	Juha Huiskonen 氏 (Institute of Biotechnology, University of Helsinki)	Restructuring of bacteriophage $\phi 6$ viral particle activates semiconservative transcription	ウイルス制御
2024. 6.26	前伸 勝実 (北海道大学大学院薬学研究院 生体分子機能学研究室)	Structural virology studies by using cryo EM facility of Hokkaido University with JX-Vir consortium	ウイルス制御
2024. 6.26	Sakiko Shiga (Department of Biological Sciences, Osaka University)	A two-day periodicity governed by the circadian clock system in a black chafer beetle <i>Holotrichia parallela</i>	数理生物学
2024. 6.28	Prof. Kenichiro Koshiyama, Tokushima University	How do we design nanoliposomes that will prey on particles?	ナノ生物工学
2024. 7.17	高田 望 (Research Assistant Professor Northwestern University, Simpson Querrey Biomedical Research Center, USA)	臓器発生を制御する代謝システムの探索	発生システム制御
2024. 7.22	井上 昌俊 Biophotonics Research Center (BRC), Mallinckrodt Institute of Radiology (MIR), Division of Biology and Biomedical Sciences (DBBS), Washington University in St. Loui	Multimodal Optical Interrogation of Brain Circuits in Social Behavior	幹細胞デコンストラクション
2024. 8. 1	Sumit Chanda (Immunology & Microbiology, Scripps Research Center for Antiviral Medicines & Pandemic Preparedness (CAMPP))	Building the plane while flying : Drug discovery during the COVID-19 pandemic	RNA ウイルス
2024. 8. 7	Kento Nakamura (理化学研究所)	Optimal control of run - and - tumble chemotaxis under sensory noise and its biochemical implementation	数理生物学
2024. 8.23	加藤 哲久 (東京大学医科学研究所 ウイルス病態制御分野)	ヘルペスウイルス病態発現機構の最先端知見	微細構造ウイルス学
2024. 9.12	6 guest speakers and 14member discuss about nanobiofluids	第2回ナノ生物流体セミナー	ナノ生物工学
2024. 9.19	Prof. Min-Ho Lee, School of Integrative Engineering, Chung-Ang University	Research Introduction & Overview of the Strategic direction for the Global R&D projects	ナノ生物工学
2024. 9.30	戸田 聡 (国立大学法人大阪大学 蛋白質研究所・准教授)	細胞間相互作用の操作による多細胞構造・機能のデザイン	発生システム制御
2024.10. 1	前田 晋太郎 (Thermo Fisher Scientific)	Unlock the New Cell-Biology with FIB-SEM	微細構造ウイルス学
2024.10. 1	小松 恵理 (Thermo Fisher Scientific)	Aquilos2 アプリケーショントレーニング	微細構造ウイルス学

開催日	講演者・所属	演 題	主催分野
2024.10.15	東京大学薬学系研究科 近江 純平 特任助教	血球膜のリン脂質脂肪酸鎖がもたらす生物学的意義	ナノ生物工学
2024.10.24	Prof. Yeon Soo Lee Department of Biomedical Engineering, College of Medical Science, Catholic University of Daegu, Korea	Locking Head Screw Mechanics for Bone Fracture Fixation and AI-based Motion Study	バイオメカニクス
2024.10.25	Prof. Shin Yoshizawa, Department of Communications Engineering, Tohoku University	Ultrasound-guided focused ultrasound treatment using cavitation bubble - From elemental technology development to startup establishment -	ナノ生物工学
2024.11. 8	Prof. Astrid D. Bakker Department of Oral Cell Biology, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA) , University of Amsterdam and Vrije Universiteit Amsterdam, The Netherlands	How Bone Cells Distinguish between Catabolic and Non-catabolic Mechanical Stimuli	バイオメカニクス
2024.11.12	Dr. Ian Hoffecker, Department of Gene Technology, KTH Royal Institute of Technology Stockholm, Sweden	Molecular imaging using optics-free spatial DNA networks	ナノ生物工学
2024.11.14	Prof. Keisuke Goda, Department of Chemistry, University of Tokyo	Intelligent image-activated cell sorting & beyond	ナノ生物工学
2024.11.21	Yasuhiro Moriwaki, PhD Keio University Div. of Basic Biological Sciences 森脇 康博 専任講師 慶應義塾大学薬学研究科	ニコチン受容体の新規機能修飾因子の発見とニコチン 受容体研究への展開 Discovery of Novel Functional Modifiers of Nicotinic Receptors and Their Application to Nicotinic Receptor Research	がん・幹細胞シグナル
2024.11.21	Prof. Teppei Shimamura, Department of Computational and Systems Biology, Medical Research Laboratory, Institute of Science Tokyo	New Frontiers in Medicine and Life Sciences Through Generative AI	ナノ生物工学
2024.11.26	Maria Carla Saleh (Head of Viruses and RNAi Unit, Institut Pasteur, Paris, France)	Enteric viral infections accelerate aging via STING- dependent NF-kB signaling	RNA ウイルス
2024.11.26	江刺 史子 (Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford)	Centromeres at the Crossroads of Growth and Quiescence	組織恒常性システム
2024.12. 9	Li-Fan Lu (Dept. Molecular Biology, School of Biological Sciences, University of California San Diego, U.S.A)	Functional specialization of regulatory T cellmediated immune regulation in health and disease	再生免疫学
2024.12.16	Prof. Vivek N. Prakash Department of Physics, College of Arts and Sciences Secondary Faculty in Biology and Marine Biology and Ecology University of Miami, Florida, USA	Fascinating Flows and Emergent Mechanics in Simple Marine Animals	バイオメカニクス
2025. 2.14	Yukako Katsura (京都大学ヒト行動進化研究セン ター)	Genome and Sex Chromosome Analyses of Japanese Frogs Carrying Both XY and ZW Chromosomes Within the Same Species	数理生物学
2025. 2.14	Prof. Kotaro Fujii, University of Florida, Center for NeuroGenetics	Controlling the fidelity of protein synthesis and its impact on disease	ナノ生物工学
2025. 3. 7	Prof. Kyohei Terao, Faculty of Engineering and Design, Kagawa University	Manipulating Single Cells and Single Molecules by Nano-Micro Structures	ナノ生物工学
2025. 3.10	Kevin Yuswan (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University)	Heterogeneous ECM dynamics regulate cell survival and abdominal epithelium remodeling in Drosophila	メカノセンシング生 理学

開催日	講演者・所属	演 題	主催分野
2025. 3.14	Naoto Yoshinaga (RIKEN Center for Sustainable Resource Science・Institute for Advanced Biosciences, Keio University)	Design of an Artificial Peptide Inspired by Transmembrane Mitochondrial Protein for Escorting Exogenous DNA into the Mitochondria	バイオメカニクス

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)
井垣 達吏 (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)
高倉 伸幸 (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)
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)
中台 枝里子 (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, 木村香葉子

<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, 神田雄大, 松郷宙倫

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, 竹本経緯子

大学院生：坂本美佳, Wu, Meng-Chi, 服部成喜, 秋葉優沙, 平松朋真, Luo, Wen-Ching 共同研究者：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，山根真弥 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：胡 上帆，山内康司，後藤真也，Ng Yen Ni，尾崎拓馬，藤原拓朗，石田大空，野上千華

学部生：長谷川 慶 研究生：LEE HOU-CHEN，都 慕軒

<がんウイルス分野>

准教授：酒井博幸 共同研究者：土方 誠

<細胞制御分野>

助教：森田大輔

大学院生：鈴木 拓（研究生）

<免疫制御分野>

（欠員中）

<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：川口 寧

■再生組織構築研究部門■

<細胞機能調節学分野>

（欠員中）

<生体科学分野>

助教：安藤 満

大学院生：Wenxuan Yang, Yumin Chen, 鷺坂太一，東 承悟，石井健人，森山敬介，木村優汰，萬田紘史

<再生免疫学分野>

教授：河本 宏 准教授：宮崎正輝 助教：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，小西理子 特定研究員：加藤雄真，西村有史，岸本加恵

特定職員：中宮真梨恵 非常勤研究員：渡邊 武，宮崎和子，清水 伸 技術補佐員：白数いづみ

事務補佐員：宮武明子 派遣職員：橋本佳奈枝，松本健佑

大学院生：板原多勇，周 浩洋，貝谷亮太，間宮茉実，西岡怜樹 民間等共同研究員：福永淳一，梅本真衣

<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

<組織再生応用分野>

連携教授：戸口田淳也 助教：金 永輝

<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）：李 京航

教務補佐員：酒井睦美 大学院生：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 大学院生：小原乃也

<病因免疫学分野>

教授：伊藤能永 助教：大崎一直 技術補佐員：辻 薫 大学院生：Ng Xue Wei，吉田康晟 研究生：Zhang Boyang

<生体再建学分野>

客員教授：坂口志文 特定助教：川上竜司

研究員（非常勤）：坂口教子，藤本秀子，伊藤寿宏

連携研究支援員：松浦真由美，藤本七恵，榮川伸吾 技術補佐員：馬野奈津子，加藤禎子，齋藤陽子，下西絢子

<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 助教：牧功一郎，金 英寛，竹田宏典，澄田裕美

研究員：須長純子 技術補佐員：平良美智代 外国人共同研究者：Marc Bosch Galera

学振特別研究員（PD）：福手淳平，横山優花 短期交流学生：Sakina Bhinderwara

大学院生：吉本昂希，鈴木龍之介，武藤剛嗣，今西 直，上平拓夢，Zhixin Zou，濱崎彩葉，井町圭輔，長谷川太一，大友 瞳，蟹川 修，上林凌也，谷尻達哉，佐藤優花

学部生：赤地悠清，鎌田朝陽，六渡美和，山田大翔，山本雄太，Gersenz Dayantsolmon，島優一郎，田口萌映，柿本源心

<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：三井優輔 特定研究員：上杉佳子，WANG ZHE，鈴木美奈子，松尾壯一

連携研究員（ASHBi 特定助教）：堤 璃水 民間等共同研究員：LEE SUMIN

大学院生：荻原龍馬，高木里奈，TU AIKE，前田梨花，覺前達允，PARK MINHONG，三崎樹生

学部生：山添雅幸，伊藤萌々菜，井ノ山源，小山怜将，MAULAD IRHASY MUHAMAD

<RNA システム分野>

（欠員中）

<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 研究員：沢里克宏

技術補佐員：小柴里美 技能補佐員：三浦健太

大学院生：山田高暉，李 明，清水洋祐，矢久保俊輝，平川 柁，吉川昂甫

<組織恒常性システム分野>

教授：豊島文子 准教授：VANDENBON Alexis Robert Paula 助教：一條 遼

特定研究員：ZAINAB Afeefa 研究員：上月智司，竹本経緯子 技術補佐員：牧 律子，Honcharuk Vladyslav

事務補佐員：原田洋子 大学院生：朴 龍鶴，梁 瀟文，趙 弘毅

<数理生物学分野>

教授：望月敦史 准教授：岡田 崇 特定准教授：境 祐二 助教：石川雅人 特定助教：山内悠平

事務補佐員：矢延聡枝 大学院生：YongJin Huang，山本溪一，林 啓敏，Maximilian Schwabe

<幹細胞遺伝学分野>

教授：遊佐宏介 助教：樽本雄介，西淵剛平，青木一成 研究員：竹田潤二

教務補佐員：杉野成一 事務補佐員：生富道子 大学院生：Shafiqul Islam，日向瑞貴，上田敦志，平野友章，You Yujin

研究生：板谷勇輝

<がん・幹細胞シグナル分野>

教授：伊藤貴浩 准教授：服部結奈 助教：松浦顕教，沖川沙祐美 特定研究員：柳沢 誠，HSU Myriam

技術補佐員：飛田直美 派遣職員（技術補佐員）：北村友理枝 派遣職員（事務補佐員）：久光京子

<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）
助教：鈴木裕輔（生命科学研究科） 教務補佐員：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：中川真美（生命科学研究科），澤田英里（生命科学研究科）
大学院生：SHAKLEINA Polina（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），
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），HUANG Xianyue（生命科学研究科），
稲澤健太（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），
ROLES Marielle（生命科学研究科），永野郁美（生命科学研究科），櫻井克柁（医学研究科），MA Chaorui（生命科学研究科），
阿保龍聖（生命科学研究科），五十川想真（生命科学研究科），小久保大暉（生命科学研究科），高辻誠也（生命科学研究科），
巽 祐司（生命科学研究科），田村拓人（生命科学研究科），筒井達哉（生命科学研究科），西野稜介（生命科学研究科），
藤原梨瑚（生命科学研究科），松尾直哉（生命科学研究科），孟 行（生命科学研究科），森田真衣（生命科学研究科），
石川芽依（生命科学研究科），稲井早希（生命科学研究科），篠原李欧（生命科学研究科），関 香祐（生命科学研究科），
高橋くるみ（生命科学研究科），根本直広（生命科学研究科），山本泰生（生命科学研究科）
研究生：浜田理志（生命科学研究科） 大学生：櫻井梨絵（薬学部）

<ナノ生物工学分野>

教授：新宅博文 助教：金子泰洸ポール，峯岸美紗 特定研究員：Mahmoud Nady Abdelmoez Atta
共同研究員：西川香里 教務補佐員：茶屋美奈子
大学院生：大塚俊輔，野崎佳司，服部聖矢 学部生：村井潤一，近藤桂祐，高室航平

<老化感染制御学分野>

教授：中台枝里子 助教：谷本佳彦 技術補佐員：田畑朱野

<メカノセンシング生理学分野>

教授：野々村恵子 研究員：田中智弘 技術補佐員：正玄裕子
大学院生：池田梨沙，石丸翔太，遠藤 響，坂根秀宣

<情報制御学分野>

連携教授：藤田尚志，加藤博己 特定助教：竹内文彦
研究員：木庭一美，赤堀祐一 技術補佐員：小柴里美，白坂勇太郎
共同研究者：山田辰太郎

■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，大附 舞 特定研究員：島崎奈津子
大学院生：王 梓涵，SANDRA MORALES RUIZ

<ウイルス共進化分野>

准教授：宮沢孝幸

技術室長補佐：宮地 均 技術係長：小中（北野）さつき 技術主任：阪脇廣美 専門職（技術）：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 技術係長：出口央士
技術主任：俣野真帆，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，宮田将史，木村圭司，茗荷邦江
研究支援推進員：古卿智英，佐々木勉，吉田美保，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：川瀬栄八郎 特定助教：高田 圭 特定研究員：藤垣静香

- ・派遣職員：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：坂本雄美 総務掛長：原 彰子 主任：中村美由紀 主任：横山祥子 技術職員：尾形幸亮

教務補佐員：采女久実子 事務補佐員：谷山佳奈美 派遣職員：稲垣きよみ、小野純子

Annual Report
of the Institute for Life and Medical Sciences,
Kyoto University
Vol.9 2024

2026年1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