

# 日本医科大学 先端医学研究所紀要

第4巻 平成30年度



*Institute for Advanced Medical Sciences  
Nippon Medical School  
Year Book*

*Vol. 4 (2018)*

**日本医科大学**  
**先端医学研究所紀要**

第4卷 平成30年度

*Institute for Advanced Medical Sciences  
Nippon Medical School  
Year Book*

*Vol. 4 2018*



平成30年6月中庭にて

# 目 次

第4巻発刊によせて	先端医学研究所・所長 南 史朗	1	
I. 病態解析学部門			
1. 研究概要		5	
2. 研究業績		10	
3. 研究紹介		13	
II. 細胞生物学部門			
1. 研究概要		21	
2. 研究業績		23	
3. 研究紹介		27	
III. 遺伝子制御学部門			
1. 研究概要		31	
2. 研究業績		35	
3. 研究紹介		37	
IV. 生体機能制御学部門			
1. 研究概要		49	
2. 研究業績		51	
3. 研究紹介		53	
V. タンパク質間相互作用学部門 (社会連携講座)			
1. 研究概要		61	
2. 研究業績		62	
3. 研究紹介		65	
VI. 平成30年度(2018年度)先端医学研究所セミナーおよびリサーチ・コロキウム			71
VII. 平成30年度(2018年度)競争的研究資金獲得状況			79
VIII. 先端医学研究所・教職員、研究者等氏名			81

## 紀要第4巻の発刊によせて

所長 南 史 朗

先端医学研究所紀要第4巻をお送り申し上げます。本紀要は、平成30年度の本研究所の研究業績を中心にまとめたものです。

本研究所は、1954年、東京都千代田区神田淡路町に創設された「老人病研究所」が起原であり、1962年には日本医科大学に移管され付置研究所となりました。1977年には東京都文京区桜木町に移転し、1990年には川崎市中原区の日本医科大学武蔵小杉病院内に移転し、2015年に名称を「先端医学研究所」と変更しました。当研究所は6部門で構成されており、うち5部門は大学院の分野を担当しています。武蔵小杉病院が建て直し工事に入るため、当研究所は東京都文京区根津の大学院棟内に移転することになりました。2018年12月には遺伝子制御学部門が移転をし、2019年以降、順次、部門ごとに移転してゆく予定です。

これまでの当研究所の歴史をふり返ると、環境が変わればおのずと研究所の性質も変わってくるのかもしれない。大学院棟に移れば、基礎医学、臨床医学、学部教育との関わりも今以上に深くなっていくことでしょう。そのような環境で、研究所が独自の存在価値をいかに発揮できるか、正念場と言えます。医学研究に携わる意味はいろいろと考えられますが、その時代によってやり方が変わってくるようです。医学部の卒後教育として専門医制度が主体となり目標ともなってきた今日、基礎研究を中心とした医学研究に傾倒する者は激減しています。それでも、研究心を培い、医学の発展に寄与することは、本学医学教育の原点ですから、大学院教育を中心に機能する当研究所としては大いに貢献してゆかねばなりません。そのためには、目を見張るような国際的に高いレベルの研究をしてゆく必要を感じます。

環境は変わっても、研究の目的や意義が変わるわけではありません。これまで以上に高揚心を持って、スタッフどうし切磋琢磨しつつ前に進んでゆきたいと思っています。

今後とも、皆様の変わらぬご指導、ご鞭撻を、何卒よろしくお願い申し上げます。

# I . 病態解析学部門

*Department of Molecular Pathophysiology*

# 病態解析学部門

## (大学院 分子細胞構造学分野)



教授 福原 茂朋

### 【研究概要】

全身を張り巡らす血管は、体のすべての細胞に酸素や栄養を供給する“生命維持に必須のライフライン”である。また、血管はホルモンなどのメッセージ物質を運搬することで臓器間ネットワークを構築し生体恒常性を維持している。このため血管の機能異常は、多岐に渡る疾患の発症・進展、さらには加齢に伴う老化とも密接に関連している。従って、健康長寿社会の実現には、血管研究の進展が極めて重要である。

当研究室では、ゼブラフィッシュやマウスをモデル動物として用い、蛍光イメージング技術を駆使することで、“血管が如何に形作られ機能しているのか?”、また“血管機能の破綻が如何に様々な病気を発症するのか?”といった疑問を分子レベルで明らかにすることを目的に研究を推進している。それにより、血管に関わる疾患の病態を解明し、それら疾患の予防法・治療法開発に向けた分子基盤の構築を目指している。以下に2018年度の研究成果の概要を示す。

#### 1. 創傷治癒における血管新生の制御機構の解明 (野一色・弓削)

(Noishiki, Yuge et al. *Angiogenesis* 22: 341-354, 2019)

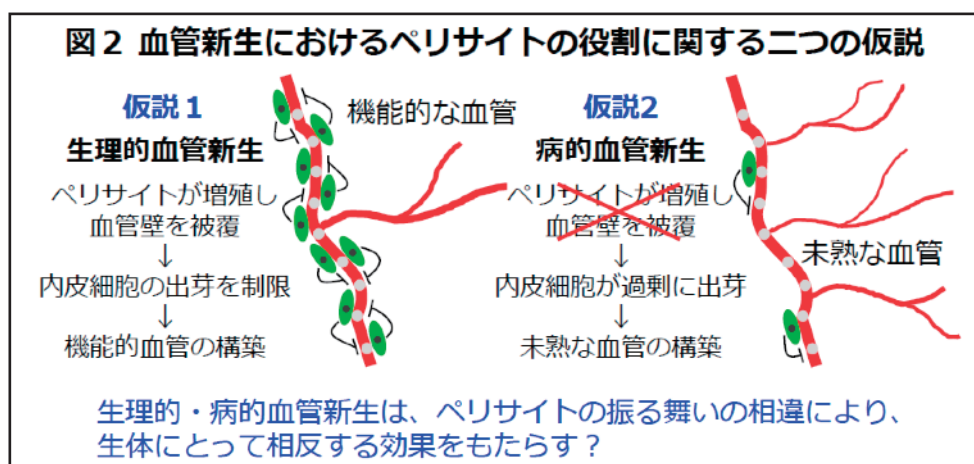
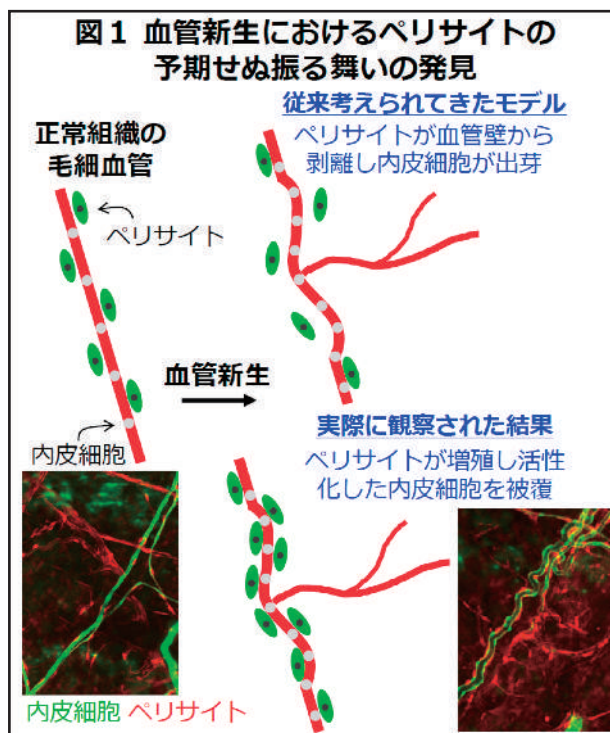
成体の正常組織ではペリサイト(周皮細胞)が内皮細胞を被覆し安定な血管構造を維持している。創傷などにより組織が虚血状態に陥ると、血管新生因子が産生され、血管新生を誘導する。血管新生因子は、血管壁からペリサイトを剥離し、内皮細胞の出芽・遊走・増殖を促すことで、虚血部位に新たな血管網を構築すると考えられている。血管新生には、創傷治癒などにおいて誘導され生体恒常性維持に寄与する生理的血管新生と癌など種々の疾患において誘導され疾患の病態を進展する病的な血管新生に分類される。しかし、生理的・病的な血管新生において内皮細胞・ペリサイトが新生血管を構築する機構については不明な点が多く、その解明は効果的な血管再生療法や病的血管新生に関わる疾患の治療法の開発につながると考えられる。本研究では、哺乳動物における創傷治癒の主なプロセスが保存されているゼブラフィッシュをモデル脊椎動物として用い、蛍光イメージング技術を駆使することで、創傷治癒における血管新生の制御機構の解明を目指した。

内皮細胞・ペリサイトで蛍光蛋白質を発現するゼブラフィッシュを用い、成魚の皮膚に損傷を加え、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて、創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞とペリサイトの動態のライブイメージング解析を行った。正常皮膚の毛細血管では、内皮細胞・ペリサイトは共に休止状態にあり安定な血管構造を維持していた。皮膚の真皮・表皮に損傷を加えたところ、損傷後2日目(2 dpi)から損傷血管の伸長と非損傷血管からの出芽が誘導された。4 dpiには、血管の出芽・分岐・吻合が活発に起こり、多くの血管で蛇行が認められ、6 dpiには、無秩序な高密度の血管網が形成された。また、全出芽の約76%は、静脈血管から起こり、主に動脈血管に吻合していた。その後、一部の血管が退縮することで無秩序な血管は正常化し、損傷1~2ヶ月後には損傷前と同様な血管網が構築された。また、創傷治癒における血管新生は血管内皮増殖因子によって誘導されることが示された。



次いで、内皮細胞とペリサイトが新生血管を形成する機構を理解するため、真皮層毛細血管を1本切断し、その修復過程を経時的に観察した。2~3dpiで血管が吻合し、損傷前とほぼ同数の内皮細胞が修復血管を構築していたが、その後も内皮細胞は増殖を続け、7 dpiには損傷前の約1.8倍まで数を増加させ、血管を蛇行させた。その後、数ヶ月に渡って内皮細胞が徐々に消失し、血管が正常化した。また、予想に反して、血管新生の誘導によって、ペリサイトは内皮細胞と同様な時間経過で数を増加させ、蛇行した血管の内皮細胞を被覆したが、血管の正常化に伴って数を減少させた。ペリサイトの増加は、ペリサイトの増殖と遊走に起因していた。

血管新生によるペリサイトの増加と蛇行血管の被覆は、「血管新生において、血管壁からのペリサイトの剥離が、内皮細胞の出芽を促す」



というこれまでの概念と矛盾する。そこで、内皮細胞の出芽部位と近傍のペリサイトの位置関係を解析したところ、内皮細胞はペリサイトの位置に無関係に出芽しており、内皮細胞の出芽にペリサイトの剥離が必ずしも必要ないことが示された。

以上の結果から、正常皮膚血管の内皮細胞、ペリサイトは休止状態にあり、安定した血管構造を維持するが、創傷によってこれら細胞は迅速に活性化し血管新生を誘導すること、また、損傷後一週間程度で、密度が高く無秩序な血管網が構築されるが、その後、過剰な血管が徐々に退縮し、数ヶ月かけて血管が正常化することが示された。さらに、血管新生では、ペリサイトが血管壁から剥離することで内皮細胞が出芽すると考えられてきたが、逆にペリサイトは血管新生の誘導によって増殖し、蛇行血管を被覆することが示された(図1)。癌や糖尿病網膜症では、ペリサイトの被覆が欠如した無秩序で機能的に未熟な血管が作られ病態を悪化させる。そのため、創傷治療などで起こる生理的血管新生では、ペリサイトが増殖し血管を被覆することで過剰な出芽を抑え、機能的な血管網を構築するが、病的血管新生では何らかの原因でペリサイトの被覆が起らず、それによって過剰な出芽が起こり、機能的に未熟な血管網が形成されると考えられる(図2)。今後、この仮説を検証することで、



生理的および病的な血管新生の制御機構の違いを明らかにし、病的血管新生が関わる疾患の病態解明、さらには治療法開発を目指す。

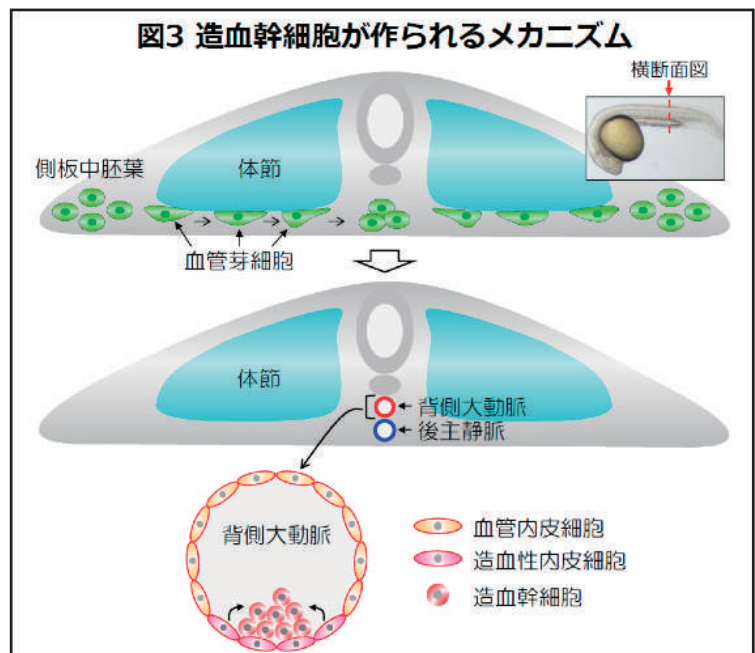
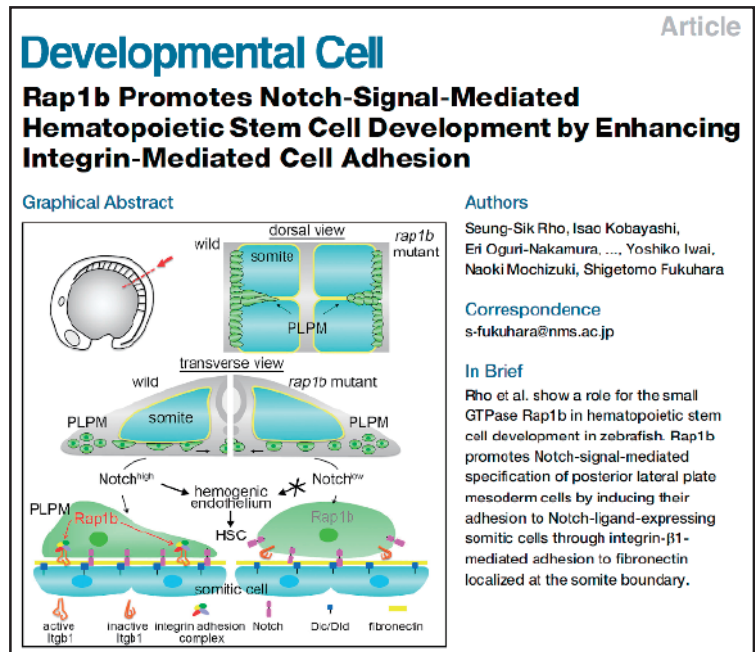
## 2. 造血幹細胞及び造血性内皮細胞の発生における低分子量 G タンパク質 Rap1 の役割とその分子メカニズムの解明 (盧・中村)

(Rho et al. *Developmental Cell* 49: 681-696, 2019)

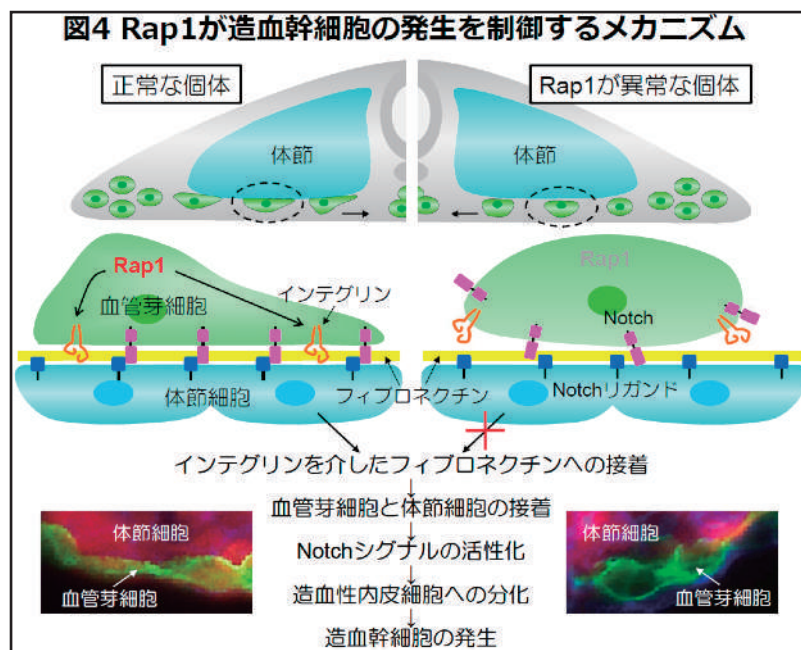
### 研究の背景

造血幹細胞は、生涯にわたって私たちの体の血液細胞を作り出す重要な細胞である。造血幹細胞と血管の内腔を覆う血管内皮細胞は、共通の前駆細胞である血管芽細胞から発生することが知られている(図3)。胎生期において、側板中胚葉に含まれる血管芽細胞は、体節の腹側領域を正中線に向かって移動し、体内の主要な血管である背側大動脈と後主静脈を形成する。背側大動脈の腹側には、造血性内皮細胞という特殊な内皮細胞が形成され、のちに内皮-造血転換という現象により造血幹細胞へと生まれかわる。

小型魚類であるゼブラフィッシュは、臓器の発生や構造がヒトと類似した脊椎動物であり、造血幹細胞の発生機序に関する多くの研究にも利用されてきた。その結果、血管芽細胞の造血性内皮細胞への運命決定に、Notchシグナルが重要であることが報告された。血管芽細胞は、体節の腹側領域を正中線に向かって移動する際に、Notchリガンドを発現する体節の細胞に接着することで、自身のNotchシグナルを活性化し、造血性内皮細胞へと分化することが報告されている(図4)。Notchリガンドは、細胞膜に存在するため、血管芽細胞がNotchシグナルを活性化するためには、体節細胞と物理的に接触する必要があるが、これら細胞間の接着がどのように制御されているかについては良く不明であった。



低分子量GTP結合タンパク質の一つであるRap1は、細胞内シグナル伝達に関わる分子で、インテグリンを活性化することで、細胞と細胞外マトリックスの接着を増強するとともに、カドヘリンを介した細胞同士の接着も促進する。本研究では、Rap1がインテグリン接着を促進することで血管芽細胞と体節細胞の接着を増強し、造血幹細胞の発生を制御していることを発見した。



#### 研究成果の概要

血管系及び造血系の発生における Rap1 の役割を明らかにするため、これらを構成する細胞に主に発現する rap1b 遺伝子を破壊したゼブラフィッシュ (rap1b 欠損フィッシュ) を樹立した。rap1b 欠損フィッシュでは、血管形成は正常であったのに対し、造血性内皮細胞及び造血幹細胞の発生が異常であった。このことから、Rap1b は血管芽細胞の内皮細胞への分化には関与しないものの、造血内皮細胞への運命決定に必要であることが示された。

Rap1b が造血性内皮細胞の発生を制御するメカニズムを知るため、rap1b 欠損フィッシュの血管芽細胞を解析したところ、Rap1b は血管芽細胞と体節細胞の接着を増強することで、血管芽細胞における Notch シグナルを活性化し、造血性内皮細胞への分化を促進していることが明らかになった (図 4)。

Rap1b が血管芽細胞と体節細胞の接着を増強するメカニズムを探るため、正中線に向かって移動する血管芽細胞の挙動とその制御機構を解析した。血管芽細胞は、インテグリンを介して体節の境界部位に蓄積するフィブロネクチンに接着し正中線に向かって遊走すること、また、このインテグリンを介したフィブロネクチンへの接着は、血管芽細胞と体節細胞の物理的な接触を促進させ、血管芽細胞における Notch シグナルの活性化と造血性内皮細胞への運命決定を制御していることが示された (図 4)。さらに、Rap1b はインテグリンを介したフィブロネクチンへの接着を促進することにより、血管芽細胞と体節細胞の接着を亢進し、血管芽細胞の Notch シグナル依存的な造血性内皮細胞への分化を誘導していることを発見した (図 4)。

今回、Rap1 によるインテグリン接着が血管芽細胞の造血性内皮細胞への運命決定に重要であることを発見し、造血幹細胞の発生機序の一端を解明した。本研究成果により、iPS 細胞から造血幹細胞を試験管内で誘導する技術の開発が進めば、白血病などの難治性血液疾患に対する根治的な治療法の開発につながる可能性がある。

### 3. 内腔圧による血管新生の制御機構の解明 (弓削)

(詳細は弓削の項を参照)

これまで、創傷治癒過程の血管新生において損傷血管が修復する際、血流に対して下流側に位置する損傷血管が伸長し血管を修復するのに対し、血流に対して上流に位置する損傷血管はほとんど伸長しないことを発見した。また、その原因として、上流側の損傷血管では、心臓のポンプ機能によって内腔圧が高く、この内腔圧が血管伸長を抑制していることを明らかにした。さらに、内腔圧が血管

伸長を抑えるメカニズムについて解析を進め、内腔圧は上流損傷血管の先端部位を拡張し、内皮細胞に伸展刺激を負荷すること、また、この伸展刺激が内皮細胞のアクチン重合と一方向移動に必要な前後軸極性を消失することで、内皮細胞の移動を抑え、血管伸長を阻害していることを明らかにした。現在、内皮細胞への伸展刺激がアクチン重合と極性形成を阻害する分子メカニズムについて解析を進めている。

#### 4. 腎血管の発生機序の解明 (西村)

(詳細は西村の項を参照)

マウスとゼブラフィッシュをモデル動物として用い、胎生期に腎臓の糸球体に血液濾過機能を有する毛細血管網が形成されるメカニズムについて解析を行った。ゼブラフィッシュでは、胎生初期に前腎が形成され数週間に渡って腎機能を果たすが、その後は数百個のネフロンからなる中腎が形成され、生涯に渡って腎機能を担っている。本研究では、前腎の糸球体に毛細血管網が構築されるメカニズムについて蛍光イメージング技術を駆使して解析した。その結果、糸球体原基が産生する血管内皮増殖因子 (VEGF) によって血管新生が誘導され、背側大動脈から血管枝が出芽・伸長し、糸球体の周囲で血管を構築すること、さらに、糸球体周囲に形成された血管が糸球体内に沈み込むように侵入し、その後、リモデリングすることで糸球体内に球状の毛細血管網が構築されることが分かった。また、糸球体内への血管の侵入には、血流が必須であることを発見した。

マウスを用いた解析に関しては、血管内皮細胞で GFP を発現するマウス胎児から腎臓を取り出し、透明化後、後腎の糸球体内に血管網が形成される様子を経時的に観察した。また、後腎の糸球体血管を構築する内皮細胞の起源についても解析を進めている。

#### 5. 成体の血管網を構築する内皮細胞の起源の解明 (藤原)

(詳細は藤原の項を参照)

血管を構築する血管内皮細胞は、胎生期中胚葉から発生した血管芽細胞から分化する。血管芽細胞は、脈管形成により原始血管叢を形成し、その後、血管新生により既存の血管から新たな血管枝が出芽・伸長することで全身に血管ネットワークを構築する。しかし、生後、体は何十倍にも成長するため、それに伴って血管も劇的に増生すると考えられるが、これら血管を構成する内皮細胞が、胎生期に発生した血管内皮細胞の増殖により供給されるのか、それとも、新たに血管内皮細胞が発生する機構が存在し、それにより供給されるのかについては明らかにされていない。また、成体で誘導される生理的及び病的な血管新生において、新たな血管内皮細胞の発生が新生血管の形成に寄与している可能性も否定できない。そこで、これら疑問を明らかにするため、マウスとゼブラフィッシュをモデル動物として用い、内皮細胞の細胞系譜解析を開始した。現在、胎生期の血管を高効率に遺伝的に標識するための条件検討を行っている。

#### 6. 血管透過性の制御における低分子量 G タンパク質 Rap1 の役割とその制御機構の解明

(盧・一宮・中村)

血管内腔面でシートを形成する内皮細胞は、血管透過性を厳密に制御することにより、生体恒常性維持に寄与する。正常組織の血管では、内皮細胞が強固な細胞間接着を形成し、血管透過性を制限している。しかし、炎症が誘導されると、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターが内皮細胞間接着を弱め、血管透過性を亢進する。このように、血管透過性はダイナミックかつ厳密に制御されており、その破綻は、炎症性疾患など様々な疾患の発症・進展と密接に関連している。

我々はこれまで、*in vitro* 実験系を用いて血管透過性制御に関わるシグナル伝達系を解析し、低分子量 G 蛋白質のひとつ“Rap1”が血管透過性制御の鍵分子であることを発見した (図5) (Nat Cell Biol 2008; J Clin Invest 2012; J Cell Biol 2013; Nat Commun 2015 他)。Rap1 は Rho ファミリー



低分子量G蛋白質のRhoAとCdc42のバランス調節により血管透過性を制御する。具体的には、Rap1は、RhoAの抑制とCdc42の活性化により、内皮細胞のアクチン細胞骨格を再編し、Vascular endothelial (VE)-cadherin(内皮特異的な細胞間接着分子)依存的な内皮細胞間接着を増強することで、血管透過性を抑えることを明らかにした。

しかし、“これら Rap1 を基軸とした上記シグナル伝達系が、生体の正常組織にける血管透過性を如何に制御しているのか? ”、また、“急性呼吸促迫症候群や癌などの疾患における血管透過性亢進に Rap1 シグナル伝達系が如何に関与しているのか? ” など不明な点が多く残されている。

これら疑問を明らかにするため、CreERT2-loxP システムを利用して、成体で内皮細胞の Rap1A・Rap1B を特異的に欠損できるマウスを導入し解析を開始した。また、ゼブラフィッシュに存在する Rap1 の3つのアイソフォーム *rap1aa*、*rap1ab*、*rap1b* を欠損した変異体ゼブラフィッシュを樹立した。今後、これらシステムを利用して、生体の血管透過性制御における Rap1 の役割とその制御機構について解析を進めていく。

## 7. 共同研究

- ・呼吸器内科との共同研究で、薬剤性肺障害を誘発する薬剤が肺血管透過性を亢進する分子メカニズムについて解析を行った。
- ・愛媛大学 東山繁樹先生との共同研究で、血管新生におけるユビキチンリガーゼの機能について研究を行った。

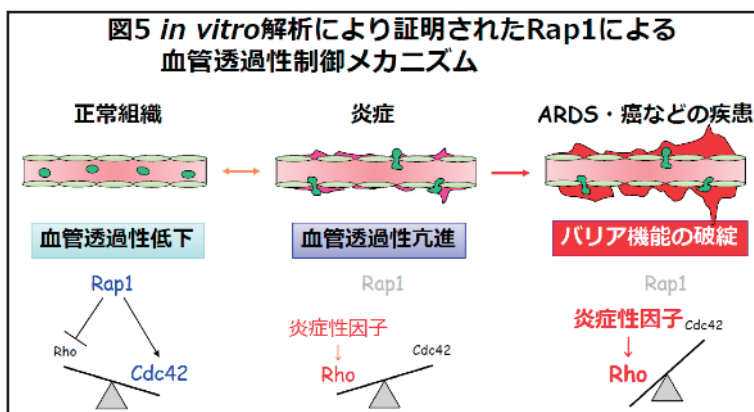
## 【研究業績】

### <原著論文>

1. Rho S., Kobayashi I., Oguri-Nakamura E., Ando K., Fujiwara M., Kamimura N., Hirata H., Iida A., Iwai Y., Mochizuki N., Fukuhara S.(Corresponding author). Rap1b promotes Notch signal-mediated hematopoietic stem cell development by enhancing integrin-mediated cell adhesion. *Developmental Cell* 49(5): 681-696.e6(2019). doi: 10.1016/j.devcel.2019.03.023
2. \*Noishiki C., \*Yuge S., Ando K., Wakayama Y., Mochizuki N., Ogawa R., Fukuhara S. (Corresponding author). Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish. *Angiogenesis* 22(2): 341-354(2019) Jan 4. doi: 10.1007/s10456-018-09660-y. \*Equal contribution.
3. Ando K., Wang W., Peng D. Chiba A., Barske L., Crump J.G., Stainier D.Y.R., Lendahl U., Lagendijk A., Koltowska K., Hogan B.M., Fukuhara S., Mochizuki N., Betsholtz C. Peri-arterial specification of vascular mural cells from naïve mesenchyme requires Notch signaling. *Development* 2019 Jan 25;146(2). doi: 10.1242/dev.165589.

### <国内外学会発表等>

1. 福原茂朋、弓削進弥、演題名「血管新生におけるメカニカルストレスの新たな役割」第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、新潟コンベンションセンター、平成31年3月27日
2. 福原茂朋、弓削進弥、演題名「創傷治癒に伴う血管新生のライブイメージングから明らかになった血管新生における内腔圧の新たな役割」日本薬学会 第139年会、千葉幕張メッセ、平成31年3月21日



3. Seung-Sik Rho, Isao Kobayashi, Koji Ando, Eri Oguri, Naoki Mochizuki, Shigetomo Fukuhara. “Rap1b regulates hematopoietic stem cell development by promoting Notch signal-mediated specification of hemogenic endothelium”, Poster, ASCB/EMBO 2018 Meeting, San Diego, USA. December 8-12, 2018
4. 西村裕介、一宮治美、渡部千里、依馬正次、望月直樹、福原茂朋 演題名「発生期腎臓において糸球体毛細血管が形成されるメカニズム」、口頭発表、第26回日本血管生物医学会学術集会（心血管代謝週間〔CVMW〕2018）、東京（東京コンベンションセンター）、平成31年12月7-8日
5. Rho, S-S., Fukuhara, S. 演題名 “Rap1 GTPase regulates Notch-dependent hematopoietic stem cell development by promoting integrin-mediated cell adhesion” 口頭発表、第41回日本分子生物学会年会、横浜（パシフィコ横浜）、平成31年11月28日-11月30日
6. 福原茂朋、演題名「蛍光イメージングが解き明かす血管構築メカニズム」第21回血管病態研究会、仙台国際ホテル、平成30年11月17日
7. 福原茂朋、演題名「創傷治癒における血管新生の蛍光ライブイメージング」生理学研究所 研究会2018「心臓・血管系の頑健性と精緻な制御を支える分子基盤の統合的解明」、自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター、平成30年11月1日
8. 福原茂朋、演題名「蛍光生体イメージングにより明らかになった血管新生における内腔圧の新たな機能」第40回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム（日本薬学会）、東北大学百周年記念会館 川内萩ホール、平成30年10月19日
9. 福原茂朋、演題名「血管新生における内皮細胞移動メカニズム」第91回日本生化学会大会、シンポジウム「組織構築・修復における細胞リポジショニング：機能的配置を決定する細胞移動メカニズム」、国立京都国際会館、平成30年9月24日
10. Rho, S-S., Fukuhara, S. “The small GTPase Rap1 regulates Notch signal-mediated hematopoietic stem cell development by enhancing integrin-mediated cell adhesion”, Poster, 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology, Osaka, Japan, Sep 14-15, 2018.
11. 福原茂朋、演題名「血管新生の蛍光生体イメージング」富山大学大学院特別セミナー（平成30年度「医学特論」）、富山大学、平成30年9月3日
12. 弓削進弥、有馬勇一郎、花田三四郎、若山勇紀、望月直樹、西山功一、福原茂朋 演題名「創傷治癒の蛍光ライブイメージングにより明らかになった新たな血管新生の制御機構」、第73回Blood Vessel Club、東京大学本郷キャンパス医学部3号館、平成30年7月30日
13. Shigetomo Fukuhara. “Angiogenesis and hematopoiesis: Lessons from zebrafish.” KAIST seminar. KAIST, Korea. July 3, 2018
14. 福原茂朋、演題名「血管形成の蛍光生体イメージング」第46回関東腎研究会、第一三共（株）A館、平成30年6月16日
15. Seung-Sik Rho, Isao Kobayashi, Koji Ando, Eri Oguri, Naoki Mochizuki, Shigetomo Fukuhara. “Rap1b regulates hematopoietic stem cell development by promoting Notch signal-mediated specification of hemogenic endothelium”, Poster, IVBM2018 (International Vascular Biology Meeting 2018), Helsinki, Finland. June 3-7, 2018

## 【研究紹介】

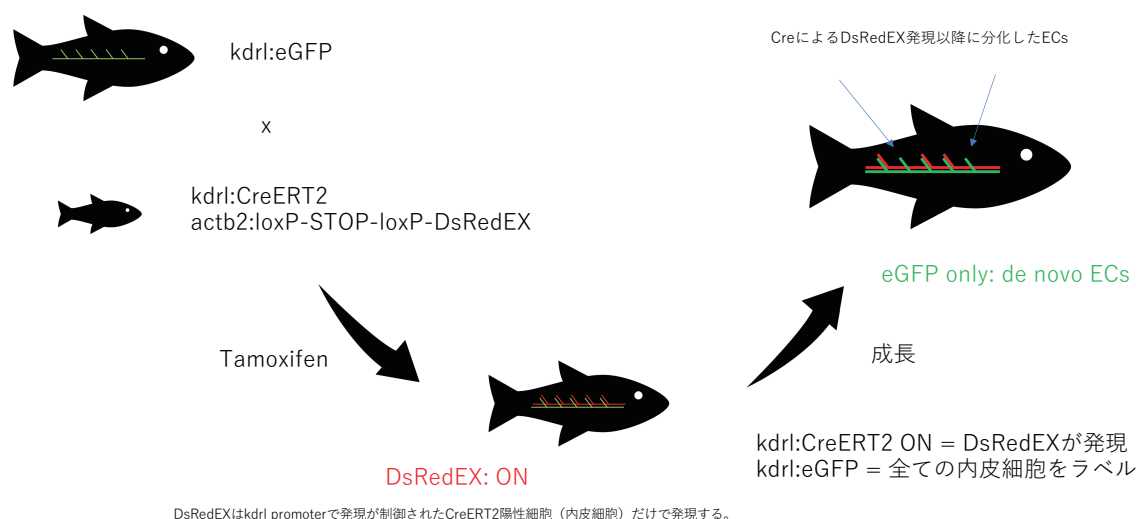
病態解析学部門  
助教 藤原正和

本年度は①「成体の血管を構成する内皮細胞の起源」と②「光遺伝学を利用した光活性型張力調節因子の開発」の2つのテーマについて研究を行い、血管形成のメカニズムについての解析を行う。

### ① 成体の血管を構成する内皮細胞の起源

血管は生体内において、ほとんど全ての組織に存在し、老廃物の回収や酸素の供給などの重要な役割を果たしている。ヒトの場合、血管は成体の全細胞数（約 37 兆個）の 2.6% であると推定されている。これらの血管は発生期において脈管形成と血管新生によって形成されていると考えられている。しかしながら、発生期に分化した内皮細胞だけで劇的に増加した成体組織全ての血管を構築できるのかについては明らかにされていない。成体組織において新たに内皮細胞に分化した細胞が血管の一部を構成している可能性も考えられる。そこで、Cre-loxP システムを用いた細胞系譜解析を行い、成体の血管を構築する血管に発生期以降に分化した内皮細胞が存在するのかを検討する。また、発生期以降に分化した内皮細胞によって成体の血管が構築されるのであれば、どの組織にどの程度存在するのかについても明らかにする。Cre-loxP システムによる細胞系譜解析はマウスとゼブラフィッシュの両方の実験動物を用いて解析を行う（下図）。

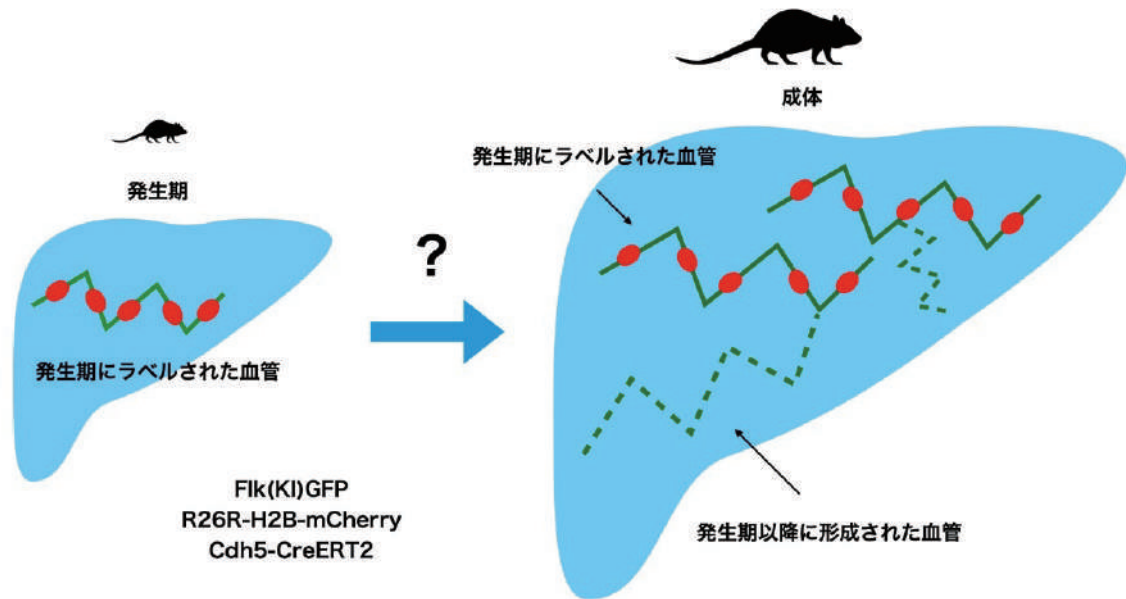
#### ゼブラフィッシュにおけるCre-loxPシステム



発生期に存在する内皮細胞を DsRedEX でラベルする。細胞のラベルは内皮細胞特異的に CreERT2 を発現する魚(kdrl:CreERT2)と CreERT2 によって組換えが起こり、DsRedEX を発現する魚(actb2:loxP-STOP-loxP-DsRedEX)を用いて行う。Tamoxifen 投与によって発生期に Cre ERT2 を活性化し、コンディショナル欠失を行い、永続的に発生期の内皮細胞を DsRedEX によってラベルする。その後、成体まで成長した魚の血管を観察し、発生期由来の DsRedEX を発現せず、成体内皮細胞で発現する kdrl: eGFP のみを発現する発生期以降に分化した内皮細胞を検索する。



## マウスにおけるCre-loxPシステム

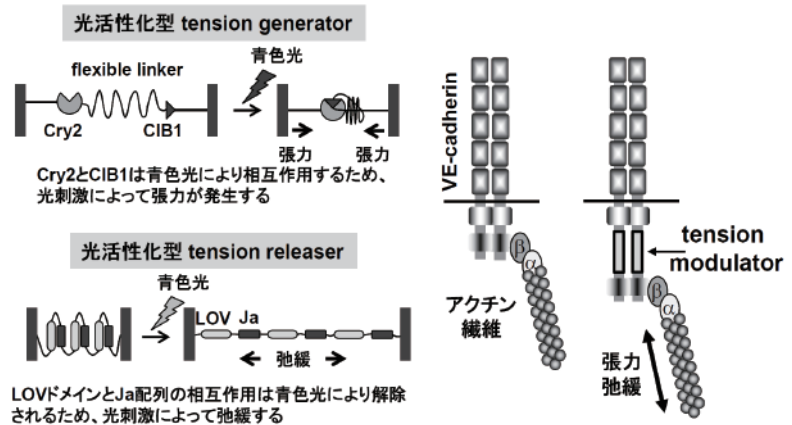


マウスでも同様に Cre-loxP システムを用いて発生期の内皮細胞を永続的にラベルし、成体になってから分化した内皮細胞と区別できるようにする。コンディショナル欠失には内皮細胞特異的に CreERT2 を発現する Cdh5-CreERT2, 内皮細胞で GFP を発現する Fik(KI)GFP, CreERT2 の標的配列である loxP を持ち mCherry を特定の時期に発現させることのできる R26R-H2B-mCherry を遺伝背景に持つマウスを用いる。胎児期に tamoxifen を投与し、内皮細胞を mCherry でラベルし、その後成長したマウスでラベルされていない血管を検索し、生体の血管を構成する内皮細胞の由来について検討する。

## ② 光遺伝学の技術を利用した光活性型張力調節因子の開発

青色光の照射によって立体構造が変化する光感性タンパク質 Cry2-CIB1 や LOV2-J $\alpha$  を細胞間接着因子 VE-cadherin などに組み込み、細胞内で人為的に張力を発生させたり弛緩させたりすることが可能な光活性化型張力調節因子を開発する (下図)。これまでに光刺激によって LOV2 の立体構造が解け、張力を解除する可能性がある分子を FRET により確認している。最終的には光刺激によって因子の立体構造を変化させ、その際発生した物理的な力によって細胞が一方向性の運動に必要な前後軸極性を獲得することを示す。これによって、接着を維持したまま集団で移動する細胞の間に生じると考えられる機械的力が内皮細胞間で情報を伝達し、秩序だった細胞の集団細胞移動に必要であることを明らかにして行きたい。

### 光遺伝学の技術を利用した光活性型張力調節因子の概要



# ゼブラフィッシュの蛍光ライブイメージングにより 明らかにした血管新生の過程と制御機構

病態解析学部門 助教 弓削 進弥

血管は、全ての器官・組織に必須の器官であり、既存の血管から出芽・伸長する『血管新生』を経て、各部位に適切に配置される。さらに新生血管は周皮細胞(ペリサイト)に被覆されて安定化する。成体では、創傷や癌など虚血に陥った組織で血管新生が誘導されるが、その詳細な過程は不明である。そこで私たちは、ゼブラフィッシュ成魚の体内を生きのまま解析できるライブイメージング法を開発し(図1)、皮膚創傷時に起こる血管新生と周皮細胞被覆の過程を明らかにする研究を行ってきた。さらに本研究の中で、損傷血管の伸長が血管の管腔内にかかる内腔圧によって調節されることを発見したため、その制御機構の解明も試みた。

本年度は、以下に取り組み、以下の成果を挙げた。

- (1) ゼブラフィッシュ成魚の皮膚の基本血管網と周皮細胞被覆、表皮～真皮の創傷時の血管新生と周皮細胞の被覆、創傷部での組織の血管新生への影響を明らかにし、論文に発表した(Yuge & Noishiki et al. *Angiogenesis* 2019)。本研究で

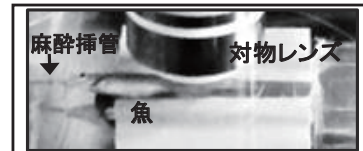


図1. ゼブラフィッシュ成魚を固定して長時間イメージングし、皮膚を顕微鏡で観察

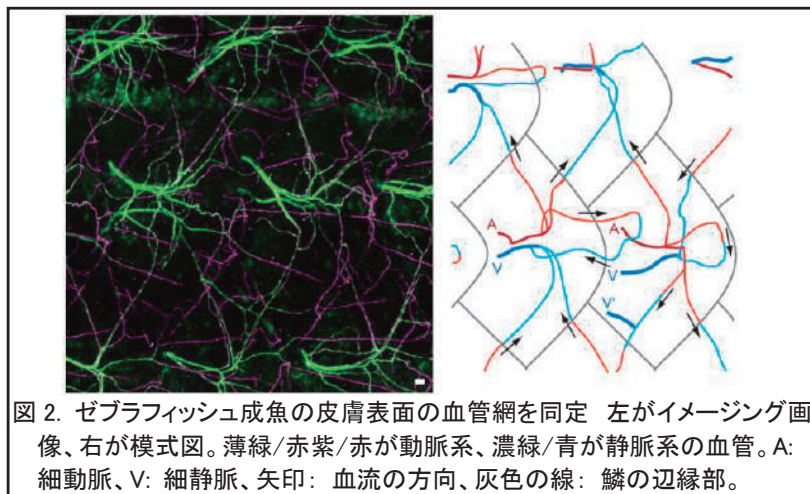


図2. ゼブラフィッシュ成魚の皮膚表面の血管網を同定 左がイメージング画像、右が模式図。薄緑/赤紫/赤が動脈系、濃緑/青が静脈系の血管。A: 細動脈、V: 細静脈、矢印: 血流の方向、灰色の線: 鱗の辺縁部。

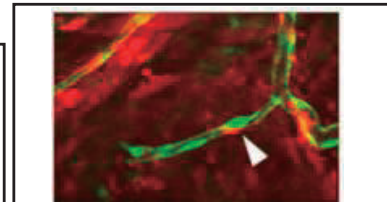


図3. ゼブラフィッシュ成魚の創傷皮膚で新たな血管(緑)が出芽・伸長(左方向)する際のペリサイト(赤、矢頭)の被覆を証明

は、博士課程の大学院生を指導し、研究配属の大学生の実習も行なった。

ゼブラフィッシュ成魚の皮膚表面では、真皮に血管網

が存在し、鱗1つの下に細動脈と細静脈があり、それらが隣の鱗の下の同血管と毛細血管でつながっていた(図2)。さらにそれら血管全てに周皮細胞が被覆していた。

これら血管網を構成する内皮細胞・周皮細胞は、正常皮膚では休止期にあり安定な血管構造を維持していたが、創傷により迅速に活性化し血管新生を誘導した。創傷後4日程度で損傷血管の伸長と非損傷血管の出芽・伸長により創傷部に血管網が形成されたが、その後も内皮細胞が増殖し血管の蛇行が見られた。また、血管新生の誘導により、周皮細胞もただちに増殖し新生血管を被覆した(図3)。その後、数ヶ月に渡って内皮細胞・周皮細胞は減少し血管が正常化した。以上より、創傷治癒における血管新生・周皮細胞被覆の過程を明らかにし、その中で新生血管を被覆した周皮細胞は、過剰な血管の出芽を抑えていることが予想された。いっぽう、創傷組織では、虚血になっていて、そこで血管内皮増殖因子(Vegf)シグナルを阻害すると、血管新生は抑制された。したがって、創傷組織では虚血によるVegf産生が血管新生を促進する可能性が考えられた。

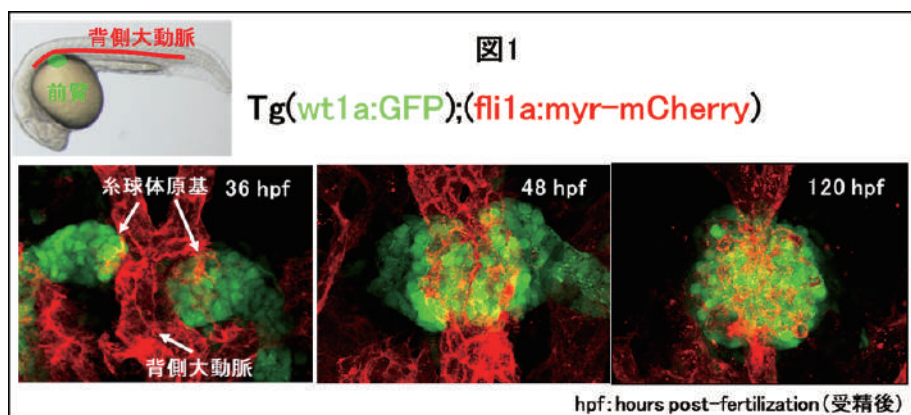
- (2) 損傷した血管の伸長は内腔圧によって調節されることを発見し、その制御に関わる分子を複数特定し、本研究室がゼブラフィッシュの成魚と稚魚のイメージングと2次元培養細胞を用いて、共同研究者の熊本大の西山功一研究室が微小流体デバイスによる3次元培養細胞を用いて、それら分子の機能を明らかにした。現在、その成果を論文にまとめている。

## 発生期腎臓における血管形成機構

腎臓は、糸球体で血液から老廃物を濾過し、尿細管で必要な水分や電解質などを再吸収して、尿を生成する。このように腎臓は、生体恒常性の維持に極めて重要な臓器であるが、血管はこれらの機能制御において中心的な役割を担っている。腎臓の血液濾過機能は、主に毛細血管が張り巡らされた糸球体が担っており、その機能は毛細血管を被覆するポドサイト、糸球体に血液を供給する輸入・輸出細動脈を覆う平滑筋細胞によって制御されている。そのため、糸球体機能が低下すると、腎臓の濾過機能が失われ、腎不全に陥る。これまで腎不全に対する治療法として、腎臓を再生する試みがなされてきたが、現段階では十分な成果は得られていない。その原因として、腎血管の形成機構が不明であるため、機能的な腎臓を構築することができなかつたことが挙げられる。そこで本研究では、マウスとゼブラフィッシュをモデル動物として用い、3D 蛍光イメージング技術を駆使することで、

下記に示す発生期腎臓における機能的な血管構築メカニズムの解明を目指している(概略図)。

今現在、ゼブラフィッシュの前腎を用いて、糸球体血管形成の解明に取り組んでいる。2つある前腎が、背側大動脈から直接出芽した内皮細胞を挟むようにして



融合し、糸球体血管を形成した(図1)。さらに、VEGF 阻害剤を内皮細胞が出芽する前に投与すると、前腎への血管伸長や侵入がなかった。上記と同じ時期に血流だけを停止

させると、前腎周囲に背側大動脈の血管が覆うように形成していたが、前腎内への血管侵入はなかった。さらに、前腎内で糸球体血管形成中に血流を停止させると、血管リモデリングは停止していた。

ゼブラフィッシュの糸球体血管形成は、背側大動脈から直接、前腎内で糸球体を形成していた。さらに阻害剤の実験から、前腎内での糸球体血管形成初期やその後の血管リモデリングに VEGF や血流が必要であることを示唆した。ゼブラフィッシュだけでなくマウスも並行して解析を進めている。

マウスでは、後腎間葉由来の血管内皮細胞と背側大動脈から侵入した内皮細胞を標識し、腎臓血管を構築する血管内皮細胞の起源を秋赤にする研究も進めている。これまでの予備的な解析から、糸球体毛細血管の内皮細胞の一部が後腎間葉細胞由来であることを示すデータを得ている。

## II. 細胞生物学部門

*Department of Biochemistry and Cell Biology*



# 細胞生物学部門

(大学院 細胞生物学分野)



教授 岩井 佳子

## 【研究概要】

PD-1 抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がん治療のパラダイムシフトが起こりつつある。本研究室では、オブジーボ (PD-1 抗体、ニボルマブ) の開発に携わった経験と、がん拠点病院である本学の特徴を生かして、がん免疫療法の新しい診断および治療法の開発を目標に研究活動を行っている。

### 1. 免疫チェックポイント阻害剤 PD-1 抗体の開発

がん免疫療法の歴史は古く、1891年にWilliam Coley博士が腫瘍内に細菌を注射する治療を行ったのがはじまりと言われている。その後、サイトカイン療法、ペプチド療法、活性化リンパ球療法、樹状細胞療法など、さまざまな免疫療法が登場したが、その効果については長い間疑問視されてきた。これまで免疫療法が効果を上げられなかった原因の一つに、免疫系を抑制する“免疫チェックポイント”の存在とその重要性が知られていなかったことがあげられる。免疫システムには、アクセル (共刺激分子) とブレーキ (共抑制分子) が存在し、前者には CD28 や ICOS など、後者には CTLA-4 や PD-1 などが含まれる。後者は「免疫チェックポイント」として機能し、自己への不適切な免疫応答や過剰な炎症反応を抑制して、組織傷害から生体を守る重要な役割を担っている。

PD-1 遺伝子は1992年に京都大学医学部医化学第一教室 (本庶佑研究室) においてクローニングされた。PD-1 は活性化T細胞に発現し、生理的なりガンド (PD-L1 および PD-L2) が結合するとT細胞の増殖やエフェクター機能を抑制して免疫寛容を誘導する。同研究室において岩井らはがんやウイルス感染細胞がPD-1 シグナルを利用して宿主の免疫監視から逃れるメカニズムを発見し、PD-1 シグナル阻害ががんや感染症の治療に有効であることを動物モデルで示し、さらにヒトへの臨床応用を目指して抗ヒトPD-1 モノクローナル抗体を作製した。その後、完全ヒト型抗ヒトPD-1 抗体 (ニボルマブ、商品名オブジーボ) が開発され、2014年に世界に先駆けて本邦で悪性黒色腫の治療薬として承認され、現在さまざまな種類のがんへ適応が拡大しつつある。

### 2. 免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療の現状

PD-1 抗体は既治療進行性末期がん患者の約20%で治療効果を認め、画期的な新薬として期待されているが、残りの約80%の症例では効果がみられない。PD-1 抗体の作用機序は、新しいエフェクターT細胞を産生するのではなく、既存のエフェクターT細胞や記憶T細胞を増やすことで免疫応答を増強しており、患者さん自身の“免疫力”や“免疫記憶”に依存している。従ってがん特異的T細胞がそもそも存在しない個体にPD-1 抗体を投与しても治療効果は期待できない。

免疫応答には個体差があり、遺伝的要因や環境要因が関与する。例えば、インフルエンザウイルスやがんに対して、免疫応答の強い人もいれば弱い人もいる。ワクチンの原理となる免疫記憶に関しても、長期間安定して持続する人もいれば、免疫記憶ができない人や持続しない人もいる。PD-1 欠損マウスはさらに興味深い表現型を示す。PD-1 欠損マウスは遺伝的背景によって、さまざまな自己免疫疾患を発症する。さらに同じ遺伝的背景であっても自己免疫疾患を発症するマウスと発症しないマウスがいる。最後の例は、免疫応答の個体差が遺伝的要因より環境などの外的要因によることを示唆する。外的要因



としては感染や食事（栄養）などが考えられるが、これらのストレスにより細胞内代謝の変化が生じて免疫担当細胞の分化に影響を及ぼす可能性がある。

### 3. 今後の課題と展望

本研究室では「免疫応答の個体差」に注目して、個体のT細胞免疫機能を評価し得る臨床検査法の開発と、がん免疫療法の鍵を握る「免疫学的記憶」形成のメカニズムの解明を目標としている。免疫応答の個体差が生まれるステップとしては、1)外的ストレスによる細胞内代謝の変化と、2)細胞内代謝による免疫担当細胞の分化制御、に分けることができるが、特に2)についてはよくわかっていない。

ナイーブなT細胞は抗原に出会うと活性化されエフェクターT細胞へと分化するが、その大部分は細胞死に至り、一部の細胞が生き残って記憶T細胞へと分化する。エフェクターT細胞と記憶T細胞では、エネルギー代謝の面で正反対の現象が起きている。エフェクターT細胞では機能を発揮するために蛋白合成が促進し、必要なエネルギーを短時間で供給するために解糖系が亢進する。一方、記憶T細胞はきたるべき抗原の再刺激にそなえて、増殖とエフェクター化を休止し、エネルギー消費をおさえて長期生存する。

これまでの研究で岩井らは bioinformatics を利用して、エフェクターT細胞と記憶T細胞で発現の異なる BATF という転写因子を見出し、BATF が Sirtuin の発現を介して、クロマチンリモデリングと同時に ATP 産生を制御することでエフェクターT細胞の分化を促進することを明らかにした。BATF 欠損マウスは多様な慢性炎症性疾患を発症するが、個体による生体防御反応や炎症応答の差が大きいため、外的ストレスに対する「免疫応答の個体差」の解析に適した理想的な動物モデルと考えられる。

一方、旧細胞生物学教室（太田研究室）ではミトコンドリア研究の蓄積がある。さまざまなストレス刺激によって免疫担当細胞を含む各種細胞から活性酸素が産生される。活性酸素は過剰に産生されると老化あるいは認知症、糖尿病、動脈硬化などの疾患の原因となるが、生理的な条件下では細胞分化などにおいて重要なシグナル伝達物質として働くことがわかってきている。太田教授のもと作製された roGFP transgenic mice は酸化還元状態に反応して蛍光が変化する緑色蛍光タンパク質を発現する。このマウスを用いた生体内イメージング技術により、これまで困難だった in vivo における酸化還元状態の測定が可能となり、代謝研究の強力なツールとなり得る。

新研究室ではミトコンドリア研究と免疫学的研究の融合により、細胞内代謝による免疫担当細胞の分化制御機構と免疫応答の個体差が生まれるメカニズムを解明して、がん免疫療法の診断や治療に結びつけたい。具体的には次のような課題に取り組んでいる。

#### 研究テーマ：

- (1) T細胞機能評価系の構築および臨床応用
  - ・T細胞機能評価系の構築・改良および各種疾患への臨床応用
  - ・癌患者の予後および免疫チェックポイント阻害剤治療効果予測法の開発
- (2) 免疫学的記憶形成のメカニズム
- (3) 免疫・炎症応答ダイバーシティ（個人差）が生じるメカニズム
  - ・免疫細胞の遊走制御機構
  - ・免疫応答物質のダイナミクス（産生、輸送、分解）
  - ・免疫療法感受性の解明

## 【平成 30 年度の活動状況】

平成 30 年 10 月 1 日付で宮部斉重講師が着任し、同日付で Alexander Wolf 講師が本学共同研究施設形態解析研究室に配置換えとなった。本年度の新規大学院生の受け入れはない。今年度の研究活動は以下のとおりである。

### (1) PD-1 結合能を有する可溶性 PD-L1 測定システムの開発 (西槇、上村、岩井)

本研究では血中に存在する可溶性 PD-L1 (soluble PD-L1: sPD-L1) に着目して、PD-1 受容体に対する結合能をもった可溶性 PD-L1 (PD-1 binding sPD-L1: bsPD-L1) を特異的に検出する新規 ELISA システムを開発し、T 細胞免疫が関与するさまざまな疾患における診断マーカーとしての有用性について検証を行っている。

従来型の ELISA システムは、“抗原-抗体反応”を介して、固相化された捕捉抗体 (抗 PD-L1 抗体) により sPD-L1 を捕捉するが、新型 ELISA システムは、“リガンド-受容体反応”を介して、固相化された PD-1 蛋白質により bsPD-L1 を捕捉する。この新型 ELISA を用いて、免疫チェックポイント阻害剤を投与された肺癌患者の血液検体について検討を行ったところ、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果との相関が示唆された (特許出願済み)。診断薬としての臨床応用を目指して現在改良中で、さまざまながんやその他の T 細胞免疫応答関連疾患の患者検体の測定を予定している。

### (2) エネルギー代謝と免疫応答メカニズムの解明

(詳細は上村の項を参照)

### (3) 慢性疾患における免疫細胞の遊走機序の解明に関する研究

(詳細は宮部の項を参照)

## 【研究業績】

### <原著論文>

1. Imanishi N, Hirai A, Yoneda K, Shimajiri S, Kuwata T, Tashima Y, Takeuchi M, Iwai Y, Ichiki Y, Tanaka F. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in pleomorphic carcinoma of the lung. *Journal of Surgical Oncology*. 117(7) :1563-1569, 2018.
2. Takeuchi M, Doi T, Obayashi K, Hirai A, Yoneda K, Tanaka F, Iwai Y. Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer. *Immunology Letters*. 196:155-160, 2018.
3. Ohsawa Y, Hagiwara H, Nishimatsu SI, Hirakawa A, Kamimura N, Ohtsubo H, Fukai Y, Murakami T, Koga Y, Goto YI, Ohta S, Sunada Y Ohsawa Y, Hagiwara H, Nishimatsu SI, Hirakawa A, Kamimura N, Ohtsubo H, Fukai Y, Murakami T, Koga Y, Goto YI, Ohta S, Sunada Y. Taurine supplementation for prevention of stroke-like episodes in MELAS: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. In press.
4. Sorensen EW, Lian J, Ozga A, Miyabe Y, Ji S, Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. CXCL10 stabilizes T cell-brain endothelial cell adhesion leading to the induction of cerebral malaria. *JCI Insight*.3(8).pii: 98911,2018.
5. Angelini A, Miyabe Y, Newsted D, Kwan HB, Miyabe C, Kelly RL, Jamy NM, Luster AD, Wittrup DK. Directed evolution of proteins with exceptional binding promiscuity and superior therapeutic efficacy. *Nature Communications*. 9(1): 1461, 2018.

## < 総説 >

1. Kamimura N, Wolf AM, Iwai Y. Development of Cancer Immunotherapy Targeting the PD-1 *Pathway*. *Journal of Nippon Medical School*. 86(1):10-14,2019.
2. Sadik CK, Miyabe Y, Sezin T, Luster AD. The critical role of C5a as an initiator of neutrophil-mediated autoimmune Inflammation of the joint and skin. *Seminars in Immunology*. 37:21-29,2018.

## < 招待講演 >

1. 岩井佳子：PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発と今後の課題 TOKYO Lung Cancer KEY Forum, 2018年6月, 東京
2. 岩井佳子:PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発 第27回昭和大学学士会シンポジウム, 2018年7月, 東京
3. 岩井佳子：PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発 スキルアップセミナー 2018, 2018年7月, 宇都宮
4. 岩井佳子：PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発 消化器内科 Science セミナー, 2018年9月, 新潟
5. 岩井佳子：PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発 第398回東北医学会例会シンポジウム, 2018年11月, 仙台
6. 岩井佳子：PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発 日本オミックス医療学会シンポジウム, 2018年11月, 東京
7. 岩井佳子：PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発 第33回日本生殖免疫学会総会・学術総会, 2018年11月, 東京
8. 岩井佳子：免疫チェックポイント阻害剤の開発およびその治療効果の特性 第59回日本肺癌学会学術集会, 2018年11月, 東京
9. 岩井佳子：PD-1 を標的としたがん免疫療法の開発 第30回文京脳腫瘍研究会, 2019年2月, 東京
10. 岩井佳子：免疫チェックポイント阻害剤の開発と今後の課題 第6回城東北がん治療セミナー, 2019年3月, 東京
11. 宮部斉重. 好中球遊走における Atypical Complement Receptor C5aR2 の機能解析. 次世代リーダーセッション. 第5回日本リウマチ学会 ベーシックリサーチカンファレンス, 2018年11月, 東京

## < 学会発表 >

1. Miyabe Y, Miyabe C, Mempel TR, Luster AD. Complement C5a receptor regulates CXCR2-mediated neutrophil adhesion. Gordon Research Seminar & Conference. "Chemotactic cytokine." 2018年6月, Newry, ME, (米国)
2. 上村尚美、西槇貴代美、Alexander M W、横田隆、岩井佳子. 酸化ストレスモニターマウスを用いた免疫細胞の解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年12月, 横浜
3. Kamimura N, Nishimaki K, Yokota T, Iwai Y. Analysis of immune cells using redox-state monitoring mice. 第92回日本薬理学会年会 2019年3月, 大阪
4. Yokota T, Hayashida K, Homma K, Sano M, Ariyoshi O, Ohta S, Sasaki J, Iwai Y. Identification of differentially expressed genes in post-cardiac arrest syndrome treated with H2 inhalation in rats: A DNA microarray study. 第92回日本薬理学会年会, 2019年3月, 大阪

## < 特許出願 >

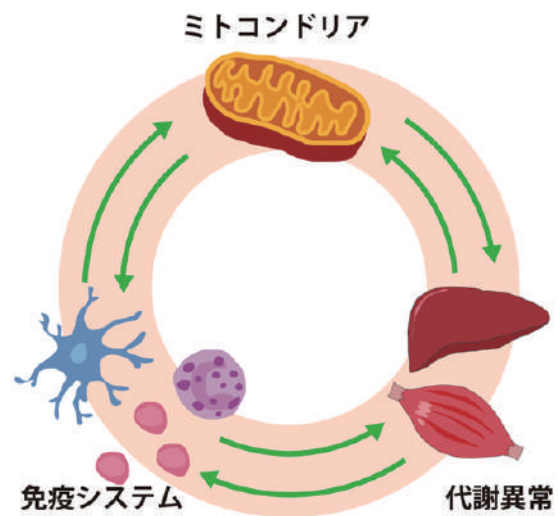
1. 発明の名称：免疫機能評価方法およびその為の ELISA システム  
発明者：岩井佳子、竹内雅大、土井知光  
基礎出願番号：特願 2017-172593  
国際出願番号：PCT/JP2018/33161
2. 発明の名称：免疫チェックポイント阻害剤の血中モニタリングおよび患者層別化方法  
発明者：岩井佳子、弦間昭彦、清家正博  
基礎出願番号：特願 2019- 46447

## 【研究紹介】

細胞生物学部門  
准教授 上村 尚美

### エネルギー代謝と免疫応答メカニズムの解明

ミトコンドリアは、電子伝達系による酸化リン酸化による ATP 産生や TCA 回路、 $\beta$  酸化などのエネルギー代謝の中心的な役割を担っており、さらに、ステロイドの合成や細胞内カルシウム濃度の調節、細胞周期やアポトーシスの調節にも大きく関わっている。また活性酸素の主要な発生源にもなっている。酸化リン酸化によるエネルギー代謝の副産物として活性酸素は生成される。さらに、紫外線への暴露、喫煙、激しい運動、ストレスなどによって過剰な活性酸素が産生される、活性酸素は生体内の抗酸化システムにより消去されるが、産生と消去のバランスが崩れた場合は活性酸素が過剰となり酸化ストレスが生じる。過剰な活性酸素は、老化あるいは糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の原因として生体にとっては有害な物質である。しかしながら、活性酸素は、病原体などの感染を感知した際の免疫応答の一つとして免疫細胞に産生され、生体の防御機構のために必須である。また、活性酸素は、免疫細胞の活性化においてシグナル物質であることも分かってきた。そこで、活性酸素による免疫細胞の制御機構の解明、および疾患との関わりを解明を目指して研究を行っている。私たちの研究室では、酸化還元状態に応答して蛍光が変化する緑色蛍光タンパク質 (roGFP) を発現するトランスジェニックマウスを作製し、生体内の活性酸素を測定する生体イメージング技術の開発を行った。roGFP マウスは2種類作製しており、一つは細胞全体の酸化還元状態を測定するマウス (CR0 マウス)、もう一つは、roGFP にミトコンドリア局在シグナルを付加しておりミトコンドリアの酸化還元状態を測定するマウス (MR0 マウス) である。作製した複数系統のマウスと野生型マウスから免疫細胞を単離して蛍光量を比較し、免疫細胞で roGFP が発現する系統を選別し、フローサイトメーターで酸化還元を測定できる実験系を構築した。この MR0、CR0 マウス免疫細胞測定系を利用して、代謝異常の疾患モデル動物での活性酸素と免疫システムの解析に取り組んでいる。

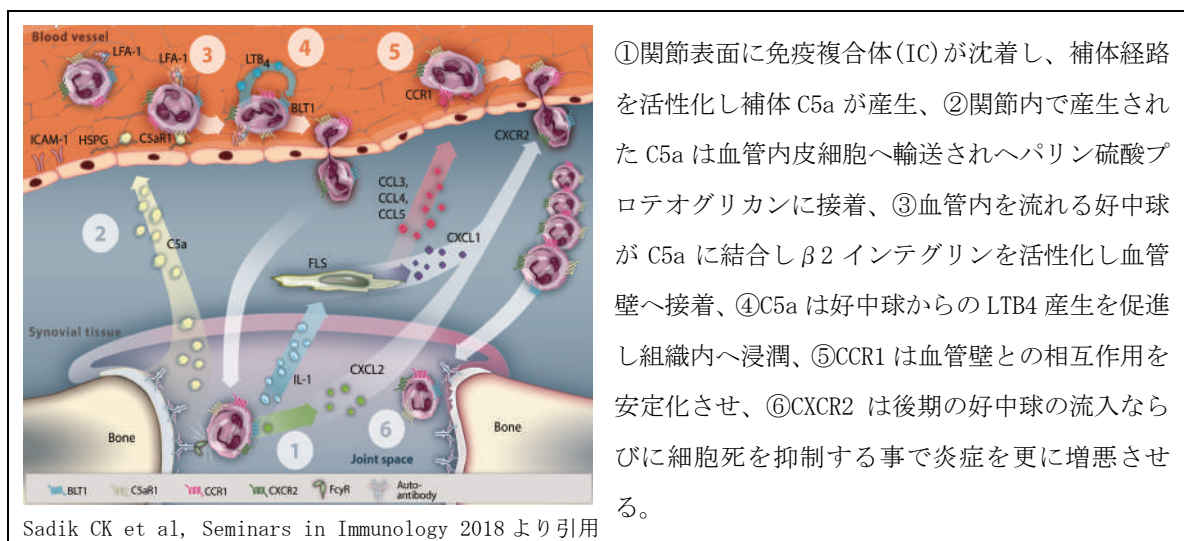




## 慢性疾患における免疫細胞の遊走機序の解明に関する研究

自己免疫疾患を含む慢性炎症の根本原因には①サイトカインによる免疫細胞の“活性化”と②Chemoattract 分子による免疫細胞の“遊走”がある。これまで自己免疫疾患の治療開発においては、活性化した免疫細胞を如何に抑制するかに力が注がれてきた。近年、サイトカイン阻害を目的とした生物学的製剤が続々と開発され、より効果的に活性化免疫細胞を抑制することが可能となった。その結果、従来の免疫抑制剤のみによる治療で効果不十分な関節リウマチなどの自己免疫疾患患者の予後は劇的に改善した。一方で、これらの治療は全身性に免疫細胞の“活性化”を阻害する為、重篤な感染症や二次発癌などの副作用が深刻な社会問題となっている。その為、臓器特異的に免疫を制御できるような次世代免疫療法の開発が望まれている。

免疫細胞の“遊走”は臓器毎に異なる Chemoattractant 分子により厳密に制御されている。このため、臓器毎の免疫細胞の遊走制御機構を解明する事は臓器特異的に免疫細胞の遊走を制御できる次世代免疫療法の開発へ繋がると期待される。一方、従来の細胞遊走の解析では複雑な細胞間相互作用や個々の細胞の動きを捉えるのは不可能であった。そこで、私達は2光子励起顕微鏡を用いて、生きたマウスの関節内インビボイメージングシステムを構築した(Miyabe Y et al, *Methods in Enzymology* 2016)。その結果、関節内に沈着した免疫複合体が補体経路を活性化させ、補体 C5a が血管内皮へ沈着し免疫細胞を異常遊走させる、新しい III 型アレルギーの発症機序を見出した (Miyabe Y et al, *Science Immunology* 2017)。補体受容体 C5aR が、細胞異常遊走の発端となる血管内皮への接着を促進し、脂質メディエーター受容体 BLT1 が免疫細胞の組織浸潤に必要であり、ケモカイン受容体 CCR1 は免疫細胞と血管内皮の接着強化、CXCR2 は遊走強化と組織内に浸潤した免疫細胞死の抑制に作用することも解明した (Miyabe Y et al, *Seminars in Immunology* 2017, Sadik CK et al, *Seminars in Immunology* 2018)。

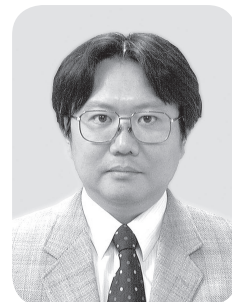




# Ⅲ. 遺伝子制御学部門

*Department of Molecular Oncology*

# 遺伝子制御学部門 (大学院 遺伝子制御学分野)



教授 田中 信之

## 【研究概要】

### 1. がん抑制因子 p53

我々は、がん抑制因子 p53 の解析を進めることで、がん化及びがん抑制の分子機構を解明することを目的に研究を行なっている。p53 は多くのヒトがん細胞で遺伝子変異が見つかっている代表的ながん抑制遺伝子であり、p53 遺伝子欠損マウスが極めて高い頻度で腫瘍が発生することから、強力ながん抑制機能を有していることが実験的にも証明されている。p53 タンパクは DNA の損傷や様々なストレスに応答して活性化し、核内で様々な遺伝子の発現を誘導する転写活性化因子として機能しており、p53 誘導遺伝子の解析から、p53 は細胞周期の停止、アポトーシスの誘導、DNA 修復の促進等を行っていると考えられている。このことから、p53 は DNA 損傷を受けた細胞で活性化され、細胞周期を停止して DNA 修復を促すと共に、修復しきれない細胞をアポトーシスによって排除することで、遺伝子の変異が蓄積しないように働くと考えられていた。その後、p53 は積極的にがん遺伝子が活性化して細胞増殖制御に異常を来した細胞を排除することで、がん化を抑制しているということが理解されるようになってきた。様々な細胞に DNA 損傷が起こると p53 依存性に細胞周期が停止するが、MYC 等のがん遺伝子を発現させた細胞は、p53 によって速やかにアポトーシスが誘導される。また、がん遺伝子 RAS を発現させた細胞は、p53 依存的に細胞の老化が誘導されることが示された。細胞は様々な DNA の変異原にさらされており、がん遺伝子が出来ることも起こり得る。このような変異を有する細胞はがん細胞にはリスクが高くなるが、p53 はこのような細胞に積極的にアポトーシスや老化を誘導して排除することでがん化を抑えているのではないかと、言い換えると p53 によるがん化の監視機構が存在すると考えられた。

### 2. これまでの我々の p53 研究の流れ

私は、インターフェロン遺伝子の転写制御因子 IRF (interferon regulatory factor) の研究の過程で、IRF-1 ががん抑制因子として機能していることを発見し、解析を進めていた。その流れで、p53 欠損マウスの細胞を解析したが (Tanaka Cell 1994, Tanaka Nature 1996)、p53 欠損マウスの胎児線維芽細胞が活性型 HRAS 遺伝子単独でトランスフォームしてヌードマウスに腫瘍を作る能力を獲得することを見出した(その意義については後述)。その後、研究の中心を p53 に移して、p53 によるアポトーシスの実行分子 NOXA を同定した (Oda, Science 2000)。NOXA は DNA 損傷に応答して p53 依存性に転写が誘導される遺伝子であり、その遺伝子産物はアポトーシス制御に重要な Bcl-2 ファミリーの中でアポトーシスを誘導する BH3 only 因子に属する新たな分子であった。更に、Noxa 遺伝子欠損マウスを作製し、NOXA が p53 依存性のアポトーシスの誘導に重要であることを明らかにした (Shibue, Genes Dev 2003)。我々の NOXA の発見の後、同じ BH3 only 因子に属する p53 誘導性因子 PUMA が同定され、p53 によるアポトーシスの誘導機構の概要が明らかとなった。

更に、p53 欠損マウス胎児線維芽細胞では転写因子 NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化していることを見出した。そこで、前述の p53 欠損細胞が活性型 HRAS 単独でトランスフォームする現象に NF- $\kappa$ B の活性化が

関与するのではないかと考え、p53に加えてNF- $\kappa$ Bのサブユニットの一つのp65を同時に欠損した胎児線維芽細胞に活性型HRASを発現させたところ、p53が全く機能しないにも関わらずトランスフォームすることは見られなかった。

そこでこの機構を解析した結果、p53欠損細胞では正常細胞に比べてグルコース消費量、即ち解糖系が亢進していること、この増大はp53/NF- $\kappa$ Bp65両欠損やNF- $\kappa$ B p65の発現を抑制すると抑えられることを見出した。がん細胞は代謝系の変化、特にミトコンドリアでの呼吸を抑えて解糖系を主なエネルギー源として増殖していることは、ワールブルグ効果と呼ばれて知られており、酸素の消費を抑えて腫瘍が増殖しやすいという利点がある。同時に、解糖系の過程で産生されるプロトンや乳酸ががん組織周辺の微小環境でアシドーシスを引き起こし、これが正常の組織を障害して腫瘍の増大やがん細胞の浸潤を容易にしていると考えられている。更に、この機構としては、グルコーストランスポーターGLUT3の発現がNF- $\kappa$ Bによって直接誘導されること、GLUT3の発現誘導がHRASによるp53欠損細胞のトランスフォームに重要であることを見出した(Kawauchi, Nat Cell Biol 2008)。同時に、p53欠損による解糖系の亢進に伴ってNF- $\kappa$ Bを活性化するキナーゼIKK $\beta$ がO-GlcNAc (O-linked-N-acetylglucosamine) 修飾を受けて活性化状態が持続することを見いだした。O-GlcNAc修飾自体は解糖系が亢進すると増大するものであり、p53が機能欠損してグルコース代謝が亢進するとこの機構を介して、癌細胞は膨大なエネルギーを作り出すのではないかと考えられた(Kawauchi, PNAS 2009)。近年、がん細胞での代謝のリプログラミング、特にそのがん化における役割が注目され、p53による代謝の制御も様々な観点から解析されており、我々の解析はその先端を行くものであると考えている。この研究はp53欠損細胞がトランスフォームすることに細胞のグルコース代謝が重要であることを明らかにしたものであるが、このことは、ヌードマウスで腫瘍を形成する細胞が発生する、即ち腫瘍開始細胞＝がん幹細胞が発生することにグルコース代謝が重要であることを示したものであると言える。

### 3. がん幹細胞

がん組織中には少数のより未分化な幹細胞の性質を持つがん幹細胞(cancer stem cells)が存在し、この細胞が分化して増殖の速いがん細胞となり腫瘍を形成すると考えられている(Nature, vol.501, pp.328-337, 2013)。がん幹細胞は、自己複製能(self-renewal capacity)を有すること、腫瘍開始(tumor initiation)能力を有すること、腫瘍内のがん細胞の大部分を構成する非腫瘍形成性がん細胞(nontumorigenic cancer cell)に分化することを特徴としており、腫瘍開始細胞(tumor initiating cells)とも呼ばれている。がん幹細胞は非常にゆっくりと自己複製を行い、多くの抗癌剤に抵抗性を示している。また、がん幹細胞は幹細胞状態と非幹細胞状態との間で可逆的に移行する可塑性を有していることが知られつつある(Cell Stem Cell, vol.16, pp. 225-238, 2015)。このことによって、化学療法で腫瘍が消失しても残存するがん幹細胞によってがんが再発する、あるいはがん幹細胞を標的として特異的に除去しても、残存する非腫瘍形成性がん細胞からがん幹細胞が再び発生することによって、がんの再発が起こると考えられている。従って、化学療法によって効果的にがん細胞を除去し再発を防ぐためには、通常の抗がん剤による非腫瘍形成性がん細胞の除去、がん幹細胞の除去、がん幹細胞の発生の抑制の3方向からの治療を考える必要がある。

それでは、がん幹細胞はどのようにして発生するのであろうか。正常の分化した細胞が4つの転写因子(c-MYC, KLF4, SOX2, OCT4)の強制発現により細胞のリプログラミングが起こって多能性幹細胞(pluripotent stem cell)に変わることが山中らによって示されている(Nat Rev Mol Cell Biol, vol.17, pp.183-193, 2016)。これらの転写因子が作用するDNA周辺のクロマチンを、転写因子複合体やそれに作用するクロマチンモディファイヤーが段階的にエピジェネティックに改変することで細胞のリプログラミングが起こると考えられている。がんにおいても、がん遺伝子と幹細胞リプログラミング遺伝子が

類似していること、がん細胞でクロマチンモディファイヤー遺伝子群に広範な変異が見られること、細胞の可塑性に対してのクロマチン構造の改変の解析などから、同様の機構が働いてがん幹細胞が発生すると考えられている (Nat Rev Genet, vol.17, pp.284-299, 2016)。がんはがん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化を段階的に受ける事で発生すると考えられていることから、これらのがん化の制御因子群のシグナルが最終的にこれらのリプログラミング制御因子に働いてがん幹細胞が発生して、この細胞を中心としてがんが発生すると考えられる。

#### 4. がんの微小環境の制御とがん幹細胞の発生及び維持

生体を構成する様々な幹細胞と同様に、がん幹細胞は微小環境内の特定のニッチ niche と呼ばれる至適の環境を提供する支持細胞群に囲まれて存在している。慢性的な炎症ががんを誘発することは実験的にも臨床解析からも広く知られており、炎症の微小環境ががんの発生、すなわちがん幹細胞の発生に重要だと推測されている (Nat Rev Cancer, vol.18, pp.359-376, 2018)。病理学的にはがんは創傷に対する生体応答と同じような環境に存在していると考えられており、創傷の応答の初期段階では免疫系細胞の浸潤、間葉系ストローマ細胞 (MSCs) の浸潤・増殖・分化、さらにそれに伴って組織の破壊と再構築が行われている。がん組織も免疫系細胞、腫瘍関連 MSCs、がん関連線維芽細胞 (CAFs) などががん組織に浸潤しており、これらの細胞からは様々な炎症性サイトカインや細胞増殖因子などが産生されている。これらの細胞やそれらの産生物ががんの微小環境を形成しており、がん幹細胞のニッチとなっていると想像される。更に、炎症ががんを誘発することから考えて、これらの微小環境ががん幹細胞へのリプログラミングに働いていることが想像される。

創傷治癒過程では正常の上皮系の細胞が炎症性サイトカインや細胞増殖因子などによって上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) を起こし、細胞極性を持たない間葉系細胞に変化し、この細胞が移動性を獲得して創傷組織の再構築が起こる。EMT ががん幹細胞の産生に働いているのではないかということが Robert A. Weinberg らのグループから示されており (Nat Rev Mol Cell Biol, vol.20, pp.64-84, 2018)、炎症の微小環境で産生される炎症性サイトカインや細胞増殖因子などが細胞内のがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異による増殖シグナルの異常などと合わさって細胞のリプログラミングを起こしてがん幹細胞が発生するのではないかと想像される。

#### 5. がん幹細胞リプログラミングにおける p53 の抑制作用

この環境要因における p53 の役割を考えてみる。炎症誘発腫瘍のモデル系の解析から、多くのサイトカインや細胞増殖因子の産生や応答に重要な転写制御因子 NF- $\kappa$ B やその活性化経路ががんの発生に重要であることが Michel Karin のグループによって示されている (Nat Rev Immunol, vol.18, pp.309-324, 2018)。一方、p53 と NF- $\kappa$ B は相互抑制することが多く報告されており、我々も p53 が核内で転写活性のある NF- $\kappa$ B—IKK 複合体のうちの IKK $\beta$  と置き換わって NF- $\kappa$ B の転写活性を抑制することを報告しており (Kawauchi, BBRC 2008)、前記の p53 欠損細胞で NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化している現象と合わせて、細胞内では p53 と NF- $\kappa$ B がお互いの働きを制限してバランスを取っていると考えられる。従って、炎症の微小環境では p53 が NF- $\kappa$ B の活性を制限することでがん化に対して抑制的に働いているのではないかと考えられる。実際、p53 欠損マウスは炎症を起こしやすいこと、自己免疫疾患モデルと組み合わせるとより重篤な症状を示すことが報告されている。さらに、炎症組織では我々が示した NF- $\kappa$ B や低酸素による HIF-1 の活性化によるエネルギー代謝の変化ががんの発生やがん幹細胞の維持に働いていることも考えられる。

2009年のNatureに山中らの論文を含む5報の連報によって p53 の不活性化が MYC, KLF4, SOX2, OCT4 の強制発現による iPS 細胞の発生を促進することが示された。この現象がなぜ起こるのかについて



ではまだ完全には明らかではない。MYCがp53の活性化を介してアポトーシスを誘導することは広く知られており、また我々はMTCやSOX2などのいくつかのリプログラミング因子がp53の活性化を介してアポトーシスや細胞老化を誘導することを見出しており、p53がリプログラミング因子の活性化した細胞を排除することは考えられる。また、様々な幹細胞の維持にグルコース代謝の亢進が必要なことが示されており、我々の発見したp53がグルコース代謝を抑制する事と合わせて考えると、p53による代謝の制御が幹細胞へのリプログラミングに抑制的に働いていることも想像される。しかしがん抑制のマスターレギュレーターとしてのp53の役割を考えると、p53が全体的に、あるいはクロマチンの特定の部位に配置されたp53が局所的にクロマチンモディファイアーに直接作用して、がん幹細胞へのリプログラミングに対する障壁となっている可能性があるのではないかと考えており、その実証み向けての方法を考えている。

## 6. 現在の研究の概要

我々は「p53が機能しないとなぜがんが出来るのか」を明らかにするために研究を進めている。さらに上記の研究の流れから、現在我々が考えていることは、がん幹細胞がいかに発生して維持されているか、更にはがん幹細胞を効果的に治療する方法を開発することにある。

我々のこれまでの研究(前述)から、p53の遺伝子変異や機能抑制とがん化のシグナルが合わさって、細胞内のグルコースの代謝経路を変化させることでがん幹細胞を作り出していることが考えられる。そこで、実際のがん幹細胞を維持するために必要なシグナルの解析を行なう過程で、ヒト肺がんや大腸がんの培養細胞株のがん幹細胞で特異的にIL-8が発現していることを清水が見出した。更に、IL-8が細胞のグルコースの取り込みとヘキソサミン生合成経路の活性化を介してタンパクのO-GlcNAc修飾を亢進させること、これのがん幹細胞の生存・維持に重要であることを見出した。同時に、O-GlcNAc修飾阻害剤であるOSMI1が腫瘍開始能力を有するがん幹細胞を枯渇させることを示して報告した(Shimizu, *Oncogene* 2019)。更にこの研究と並行して、がんを含む様々な幹細胞の維持に関わるHedgehog経路の標的転写因子であるGLI1が、アダプター分子MEP50を介してアルギニンアルギニンメチル基転移酵素PRMT5と複合体を作りGLI1のArg990とArg1018がメチル化されること、これらのメチル化がユビキチンリガーゼITCH/NUMBとの結合を阻害してGLI1を活性化することを阿部が初めて見出した(Abe, *Commun Biol*, 2019)。

谷村は炎症誘発がんの発生メカニズムを、大腸がんを中心に解析している。潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患(IBD)では発がんのリスクが高くなっているが、IBD患者の腫瘍組織ではp53の変異が高頻度に見られること、前がん病変である異型上皮の段階でp53の変異が起こっておりことが報告されている。また、大腸がん発生のモデル系では細菌感染に応答する自然免疫系の主体であるTLRs(Toll-like Receptors)のシグナル伝達分子MyD88を欠損させると、腫瘍の発生が抑制されることが見出されている。そこでMyD88のがん化に及ぼす影響を、p53欠損細胞を用いて検討した結果、MyD88によって活性化したNF- $\kappa$ Bの経路とMAPKの経路が転写因子HIF-1 $\alpha$ の転写活性化及び翻訳効率の増加を介してHIF-1を活性化することを見出した。更に、変異体MyD88を発現させたp53欠損細胞はがん幹細胞を発生させること、この現象にはNF- $\kappa$ B-HIF-1の活性化経路が必須であることを見出した。

岩淵はEGFR陽性非小細胞肺癌細胞株をEGFRの分子標的薬であるGefitinibによって処理するとHIF-1 $\alpha$ の分解が促進することから、VHLを介した分解を受けない安定型HIF-1 $\alpha$ を発現させたところ、Gefitinibに対して耐性を獲得すること、この機構にはアポトーシス抑制因子BCL-X<sub>L</sub>とMcl-1発現誘導が重要なことを明らかにした。HIF-1はがん幹細胞の維持にも重要なこと、は炎症によっても誘導されることから、がん微小環境ではHIF-1を介してがん幹細胞がアポトーシスを免れていることが考えられる。更に、谷村の解析からもHIF-1ががん幹細胞の発生に重要であり、HIF-1による代謝の制御が

細胞のリプログラミングの制御に関与しているのではないかと推測し、現在これらの解析を中心に行っている。

上原は p53 と IFN- $\alpha/\beta$  受容体 (IFNAR1) を同時に欠損させたマウスは p53 欠損マウスに比べて腫瘍の自然発生が遅れるという現象を発見した。この I 型 IFN の発がん促進効果について解析した結果、I 型 IFN ががん幹細胞の維持に関わっていることを発見した。IFN- $\alpha/\beta$  はマウスとヒトで互換性がないことから、ヒトがん細胞にマウス IFN- $\alpha/\beta$  受容体を発現させてヌードマウスに移植すると腫瘍の増大がみられ、またゲノム編集で IFNAR1 をノックアウトしたヒトがん細胞は移植腫瘍の成長が抑制される結果を得ている。同時に p53 欠損細胞では異常な DNA 複製によって細胞質内の DNA が増加し、これによって細胞内 DNA センサーである cGAS-STING 経路が活性化して I 型 IFN を産生することも見出している。従って、がんの微小環境では炎症細胞やがん間質細胞から産生された I 型 IFN とがん細胞自らが産生する I 型 IFN によってがん幹細胞が維持されているのではないかと考えられる。I 型 IFN はがん細胞の増殖を抑制することから、細胞増殖や代謝の抑制によってがん幹細胞の stemness を維持しているのではないかということも考えられ、現在解析を進めている。

中嶋は一貫してアポトーシスの分子機構の解明、抗がん剤によるアポトーシス誘導の分子機構、抗がん剤感受性を規定する因子の同定を進めて多くの成果をあげており、特に乳がん細胞に対する微小管重合阻害薬の感受性を規定する因子の同定や肺がんや白血病などの化学療法感受性を規定する因子の同定や耐性化機序を中心に研究を進めている。中嶋の研究は有効ながん治療の方法の開発や治療抵抗性のがんに対する新たな治療法を開発を、これまでに積み上げたアポトーシス誘導の分子メカニズムの研究から行うものであり、乳腺外科、病理学教室、呼吸器内科学教室、血液内科学教室と共同で研究を行っている。

## 【平成 30 年度業績】

### ＜原著論文＞

1. Sharma K, Vu, TT, Cook W, Naseri M, Zhan K, Nakajima W, Harada H. p53-independent Noxa induction by cisplatin is regulated by ATF3/ATF4 in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Molecular oncology*, 12, 788-798 (2018).
2. Uehara I, Tanaka N. Role of p53 in the Regulation of the Inflammatory Tumor Microenvironment and Tumor Suppression. *Cancers* 10. pii: E219 (2018)
3. Shimizu M, Tanaka N. IL-8-induced O-GlcNAc modification via GLUT3 and GFAT regulates cancer stem cell-like properties in colon and lung cancer cells. *Oncogene* 38, 1520–1533 (2019).
4. Abe Y, Suzuki Y, Kawamura K, Tanaka N. MEP50/PRMT5-mediated methylation activates GLI1 in Hedgehog signalling through inhibition of ubiquitination by the ITCH/NUMB complex. *Communications Biology* 2, Article number: 23 (2019).

### ＜学会発表＞

1. 阿部芳憲, 田中信之: PRMT5 Mediated Gli1 Activation Pathway Maintains Cancer Stem Cells in Non-Small Cell Lung Cancer The 6th JCA-AACR Special Joint Conference 2018 年 7 月 京都
2. 中嶋亘, 栗田智子, 内藤善哉, 武井寛幸, 田中信之: 微小管阻害薬パクリタキセルに対する細胞死誘導機構の解析 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 大阪
3. 阿部芳憲, 田中信之: CRISPR/CAS9 システムによる GLI1 ノックアウト肺腺癌細胞の解析 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 大阪
4. 上原郁野, 田中信之: Effect of type I interferon in cancer stem cell maintenance and tumorigenesis. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 大阪



5. 谷村篤子, 中里茜, 田中信之: MyD88 シグナルは NF $\kappa$ B-HIF1 $\alpha$ を介して癌化を誘導する 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 大阪
6. 土佐眞美子, 阿部芳憲, 田中信之, 小川令 ケロイド新治療薬開発への挑戦 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会 2018 年 10 月 東京
7. 中嶋亘, 浅野由ミ, 栗田智子, 内藤善哉, 武井寛幸, 田中信之: BRCAness 乳癌細胞株の微小管阻害薬パクリタキセルに対する抵抗性機構の解析 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 横浜
8. 阿部芳憲, 谷村篤子, 上原郁野, 田中信之: アルギニンメチル基転移酵素 PRMT5 の大腸癌における役割 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 横浜
9. 谷村篤子, 中里茜, 田中信之: MyD88 シグナルは NF $\kappa$ B-HIF1 $\alpha$ を介して癌化を誘導する 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 横浜
10. 岩渕千里, 田中信之: 転写因子 HIF-1 $\alpha$ による薬剤耐性獲得と癌幹細胞維持機構の解析 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 横浜

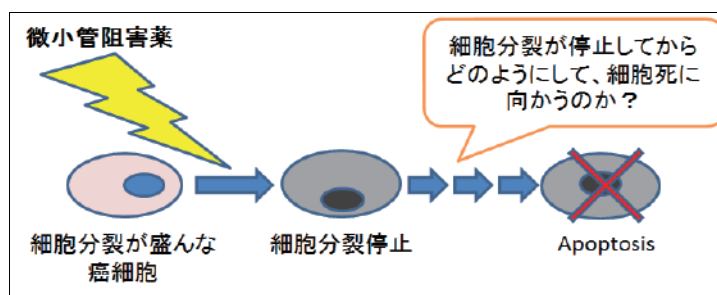
## 【研究紹介】

【中嶋 亘】

2009 年に老人病研究所免疫部門（現在は先端医学研究所遺伝子制御学部門）に助教として赴任してから、一貫してプログラム細胞死（アポトーシス）の研究を続けてきました。ミトコンドリアを介するアポトーシスは Bcl-2 ファミリー分子と呼ばれる遺伝子群によって制御されており、アポトーシス実行因子である Bax と Bak の 2 つの分子が活性化することでアポトーシスが実行されることが知られています。しかしながら、Bax および Bak の活性化機構は未だに不明な点が多く、これらの Bax、Bak の活性化機構を理解することはアポトーシスを理解するうえで必要不可欠であり、癌化学療法でよく報告される抗癌剤耐性機構を深く知るのに非常に有意義であると考え、研究を続けてきました。

特に 2012 年以降はアポトーシス研究を応用し、実際に医療の現場に貢献できるような研究をしたいと考え、抗癌剤の作用機序をより詳しく調べる事から薬剤の効き方を意識して研究を行ってまいりました。

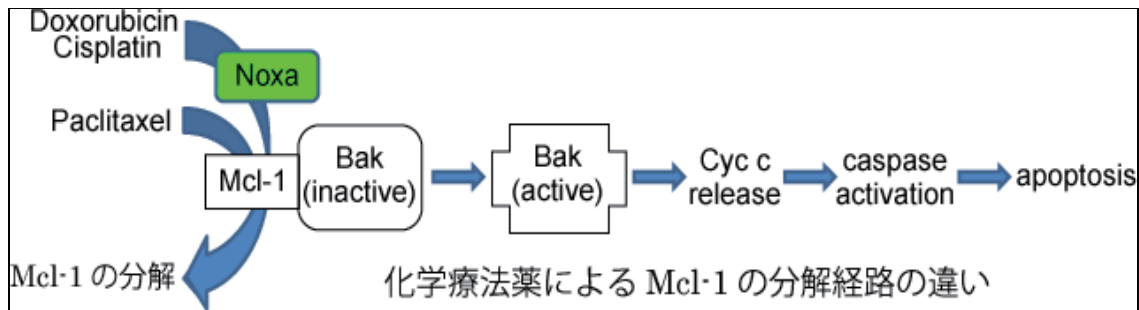
今日、外科療法が困難な癌に対しては抗癌剤を用いた化学療法が主流となっていますが、その効果は癌の種類や段階によって大きく異なるのが現状です。通常、抗癌剤投与によって癌細胞に細胞死（apoptosis）を誘導することでその効果が期待されますが、癌細胞の種類によってはその apoptosis 誘導効果が著しく乏しく、単に QOL の低下のみを招くこともあります。したがって化学療法の治療前に効果がどの程度見込めるのかを客観的に判断する為の、有効なバイオマーカーの同定が望まれます。微小管重合促進剤パクリタキセルや DNA 損傷誘導抗癌剤であるシスプラチンは古くから用いられてきた抗癌剤で、現在も世界で最も多く使われている抗癌剤の一つです。



### 微小管阻害薬によるアポトーシス誘導

エリブリンや、パクリタキセルと言った微小管阻害薬は細胞分裂を阻害することでアポトーシスを誘導するが、細胞分裂を阻害された癌細胞がどのような分子機構でアポトーシスが引き起こされるのかはよくわかっていない。

これら、パクリタキセルやシスプラチンを培養細胞株へ処理すると、どちらの薬剤も感受性株では最終的にはアポトーシス抑制遺伝子 Mcl-1 が分解されることでアポトーシスが誘導されますが、抗癌剤耐性株では抗癌剤処理を受けてもアポトーシス抑制遺伝子 Mcl-1 が分解を免れることでアポトーシスが誘導されず、感受性株と抵抗性株との違いを決定づける分子機構の一端となっていることがわかってきました。しかしながらこの一連のアポトーシス抑制遺伝子 Mcl-1 の分解機構は未だに不明な点が多く残されており、この Mcl-1 の分解機構を詳細に知ることが抵抗性株での薬剤効果の改善を図るうえでもとても重要となってきます。我々のこれまでの分子生物学的手法を用いた解析によって、パクリタキセルやシスプラチン処理時に誘導される Mcl-1 分解の詳細な分子機構を解明し、学術論文として 2014 年より数えて 9 報の原著論文を報告してきました。



各化学療法薬により Mcl-1 が分解されると、Bak が活性化しミトコンドリアから Cytochrome c の放出を経て Caspase が活性化しアポトーシスが誘導される。

平成 30 年度は、頭頸部癌において、DNA damage agent により p53 非依存的にアポトーシス促進因子 Noxa を誘導する転写因子 ATF3/4 を同定し、Molecular Oncology 誌に報告しました。現在、日本医科大学の臨床部門である乳腺科や血液内科と連携し、予後不良なタイプでの癌で化学療法薬の効果を高める手法を考え、日夜研究を行っています。

【阿部芳憲】

私が焦点を当てている hedgehog シグナル伝達経路は、様々な器官形成やその維持だけでなく、細胞増殖や分化など様々な場面で重要な役割を果たす。それだけでなく、hedgehog シグナル伝達経路の制御機構の破綻は様々な部位で細胞の癌化に関わることも分かって来た。

Hedgehog シグナル伝達経路下流で機能する転写制御因子 GLI ファミリーの中で、細胞の癌化には GLI1 が主に関与していると言われているが、GLI1 活性化機構には未解決の部分が多く残っていた。そこで GLI1 の制御機構を明らかにする目的で解析を進めた結果、GLI1 の機能制御に関わる新規分子としてアルギニンメチル基転移酵素複合体である PRMT5-MEP50 複合体を同定した。そして PRMT5-MEP50 複合体は GLI1 をメチル化し、GLI1 タンパク質を安定化させて活性化へ導くことが分かった。さらに hedgehog シグナル伝達経路が恒常的に活性化している肺癌および胃癌細胞で、RNAi 法を行って PRMT5 や GLI1 を発現抑制すると、腫瘍形成能が抑制されることも分かった。この新しい GLI1 制御機構は、2019 年 1 月に Communications Biology 誌に掲載された。

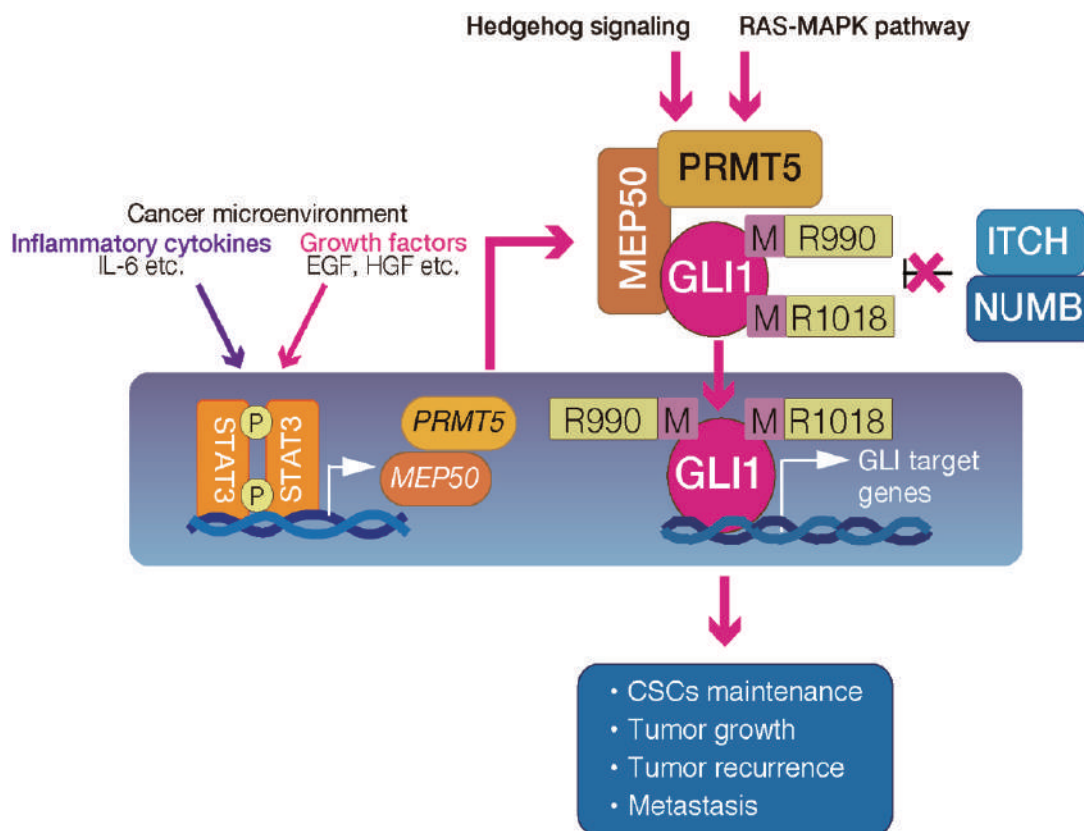


図 1: PRMT5-MEP50 複合体を介した新しい GLI1 活性化機構

PRMT5 とその子ファクターである MEP50 はサイトカインシグナルや細胞増殖因子シグナルの下流で活性化される STAT3 によって発現制御される。発現誘導された PRMT5-MEP50 複合体は、hedgehog シグナル経路や RAS-MAPK シグナル伝達経路の下流で GLI1 をメチル化して安定化し、活性化へと導く。この経路は癌幹細胞の維持に重要な役割を果たし、腫瘍形成に関与していると考えられる。

その後の解析から、*EGFR* 遺伝子変異を持つ肺癌細胞や *KRAS* 遺伝子変異を持つ膵臓癌および肺癌細胞で、PRMT5-MEP50 複合体は増殖因子シグナルやサイトカインシグナルの下流で hedgehog シグナル伝達経路非依存的に GLI1 を安定化し、活性化へ導くことが分かった。そしてこれらの癌細胞で見られる hedgehog シグナル伝達経路非依存的な PRMT5-MEP50 複合体を介した GLI1 活性化経路は、癌幹細胞の維持において重要な役割を果たしていることも分かった（論文投稿準備中）。さらに最近になって、RAS-MAPK 経路の下流で PRMT5 の発現だけでなく活性も制御されていることを示唆する結果を得た（図 1）。

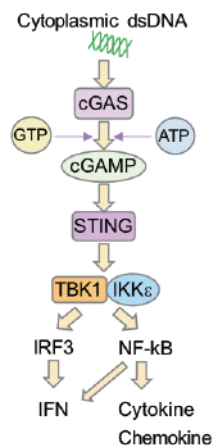
*KRAS* 遺伝子の変異は膵臓癌の約 95%、肺癌の約 15–30%で見られる。現在、*KRAS* 遺伝子変異を持つ癌に対する効果的な治療法はないが、PRMT5-MEP50-GLI1 経路を遮断することが、*KRAS* 遺伝子変異を持つ癌に対する治療法開発のための新しい標的になる可能性が考えられた。そしてこのほど GlaxoSmithKline の協力のもと、この経路を遮断することが膵臓癌の有効な治療法となる可能性について探る研究をスタートさせる。

これまでは PRMT5 を介した GLI1 活性化経路に焦点を当てて研究してきたが、細胞の癌化の過程において PRMT5 の役割はより多岐に渡っていると推測される。そこで東京大学免疫学教室より PRMT5 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスの分与を受け、膵臓癌モデルマウスを使い、膵臓癌発症における PRMT5 の役割を詳細に解析する予定である。本研究を通して、PRMT5 を介した新しい膵臓癌発症の分子機構が明らかになればと考えている。



## 【上原郁野】

がん細胞維持における I 型インターフェロン (IFN- $\alpha/\beta$ ) の役割



I 型インターフェロン(IFN- $\alpha/\beta$ )は、生体内へ侵入するウイルス感染に応答し、その増殖を抑制するために体内で作られる因子であり、腫瘍細胞増殖抑制作用も知られている。近年、病原体感染時以外の新たな IFN- $\alpha/\beta$  産生メカニズムとして、細胞質 DNA センサーである cGAS-STING 経路 (左図) が、老化や染色体不安定性により核から放出され細胞質に蓄積したクロマチンを認識して、IFN- $\alpha/\beta$  や炎症性サイトカインが産生され、特に炎症性サイトカインが細胞老化関連分泌物質(SASP)として慢性炎症を起こし、発がんやがん転移への関与がみられる現象が報告されている。しかし、この時同時に産生される IFN- $\alpha/\beta$  の機能に関しては、よくわかっていない。

私は今までに IFN- $\alpha/\beta$  の制御因子及びがん抑制遺伝子 p53 による癌抑制機構の研究を行ってきた。その中で、本来腫瘍細胞の増殖を抑制する IFN- $\alpha/\beta$  の発現が、がん細胞でも恒常的に見られること、p53 欠損のマウス胎児線維芽細胞(p53KO MEF)への DNA 損傷刺激時やがん遺伝子である H-ras 発現時に、野生型と比較して、IFN- $\alpha/\beta$  や IFN 誘導遺伝子群の発現が亢進することを見出した。そこで、がん細胞やがん化ストレスを受けている細胞において、どのような機構で IFN- $\alpha/\beta$  が産生されるのか、産生された IFN- $\alpha/\beta$  はがん化においてどのような役割があるのかを解明することを目的として実験を行ってきた。

今までの研究結果から、IFN- $\alpha/\beta$  はがん幹細胞の維持に関与している可能性が示された。

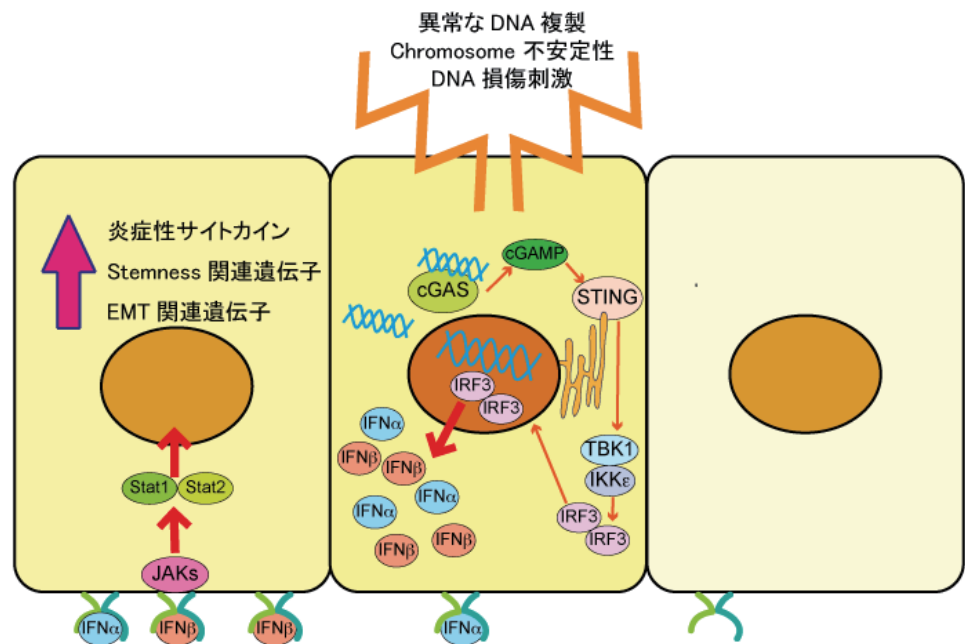
- ・がん幹細胞の指標となる sphere 形成において、sphere を形成したがん細胞自体が IFN- $\alpha/\beta$  を産生していること。
- ・IFN- $\beta$  で刺激したがん細胞は、増殖は抑制されるが、sphere 形成能が上昇し、幹細胞マーカーや炎症性サイトカイン、グルコース代謝関連遺伝子の mRNA レベルでの発現上昇が確認できること。
- ・p53 と IFN- $\alpha/\beta$  受容体両欠損マウスを作成し解析したところ、p53 単独欠損マウスに比べて腫瘍の発生が遅く、生存期間が長い傾向があること。
- ・IFN- $\beta$  処理で sphere を形成するヒト由来のがん細胞に、マウスの IFN- $\alpha/\beta$  受容体 1 (mIFNAR1) を恒常的に発現させた細胞と、ヒトの IFN- $\alpha/\beta$  受容体 1 (hIFNAR1) を欠損させた細胞を作成し、ヌードマウスに移植し腫瘍作成実験を行ったところ、mIFNAR1 を発現させたがん細胞の腫瘍はコントロールと比べて大きく、hIFNAR1 を欠損させた細胞の腫瘍は小さくなる傾向が見られたこと。

平成 30 年度は、がん細胞や p53KO MEF において、異常な DNA 複製により、細胞質内の二本鎖 DNA の濃度が恒常的に高くなっていることを見出した。さらに、cGAS-STING 経路の STING を knockdown することにより、DNA 損傷刺激時の IFN- $\alpha/\beta$  や IFN 誘導遺伝子群の発現亢進が抑制されることがわかった。よって、がん細胞やがん化ストレスを受けている細胞は、常に細胞質 DNA 量が多く、cGAS-STING 経路を介して IFN- $\alpha/\beta$  を産生していることを明らかにした。

よって以上の結果をまとめると、図に示した cGAS-STING 経路を介した IFN- $\alpha/\beta$  産生によって、がん細胞自体の増殖は抑えるが、がん幹細胞の維持に関与し、腫瘍形成に関与しているのではないかと考えられた。

今後は、ヒト由来のがん細胞ではなく、マウス由来のがん細胞で、同様の現象が見られるかを検

証する。さらに、T 細胞欠如による免疫不全のヌードマウスではなく、免疫機能の正常な野生型のマウスや IFNAR1 欠損マウスに、IFN- $\alpha/\beta$  の影響を受けるマウス由来のがん細胞を移植し、IFN- $\alpha/\beta$  のがん化に関する機能解析を進めて行く。



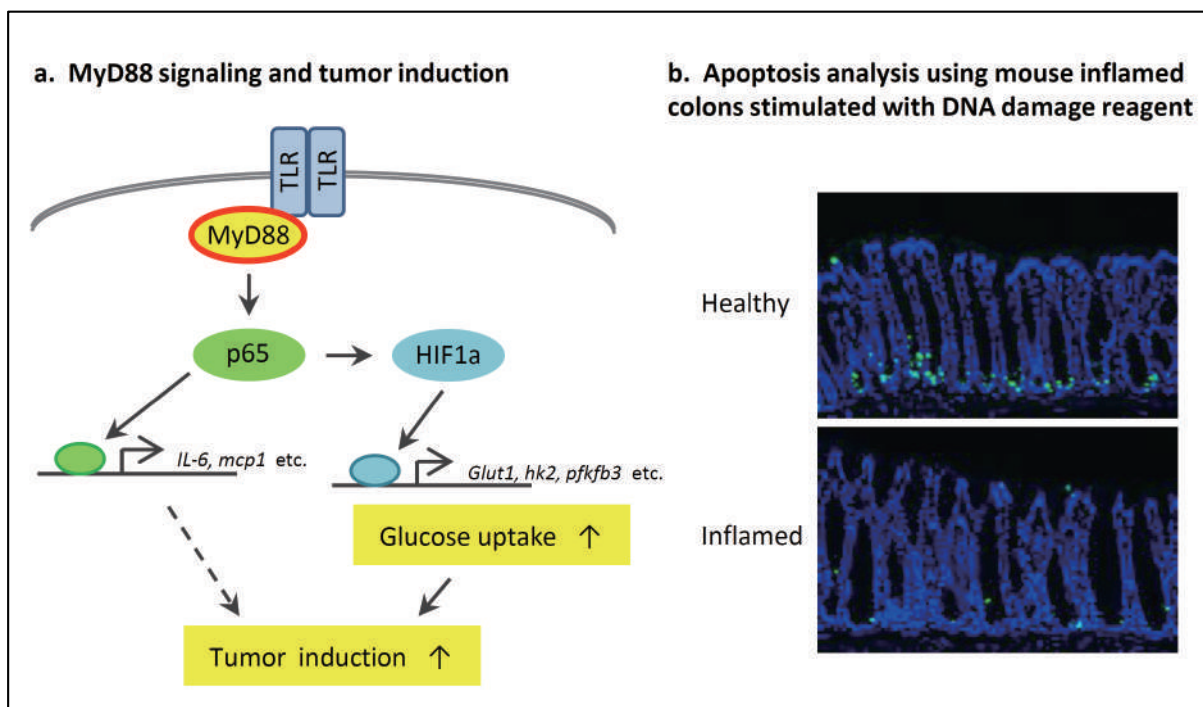
がん細胞による異常な DNA 複製・Chromosome 不安定性・DNA 損傷刺激により、細胞質中に断片化した DNA が放出されると、cGAS-STING 経路が活性化し、IFN- $\alpha/\beta$  が産生される。この IFN- $\alpha/\beta$  が自己および周囲の細胞を刺激して、炎症性サイトカインや Stemness 関連遺伝子群の発現を誘導することで、がん幹細胞の維持に関与していると推察される。

【谷村篤子】

なぜ炎症部位で発がんが起こるのか？

慢性炎症が発がんに関与していることは広く知られている。実際にヒト大腸がんの罹患リスクは炎症性腸疾患により上昇し、罹患年月とともに増加する。また、実験動物を用いた系では発がん剤投与に引き続き大腸炎を誘導することで、発がん剤の単剤投与より高率かつ短時間で大腸に腫瘍を発生させることが出来る。

慢性炎症がどのように発がんを促進するのかという事は興味深いテーマであり、その機序の解明は発がん抑制に重要である。そこで、炎症と発がんについて以下の2つの視点から研究を行っている。



### 1. 異常な炎症シグナルは発がんを引き起こすか？

炎症反応は体内に侵入した細菌などの異物を排除する機構である。生体の細菌感染は細胞上の受容体 TLRs (Toll-like Receptors) によって感知され、シグナル伝達によって転写因子 NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B) や IRF (Interferon regulatory factor) を活性化させる。NF- $\kappa$ B や IRF はサイトカインやケモカインなどの転写を誘導し、獲得免疫や炎症を誘導する。炎症性サイトカインである TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) や IL-6 (Interleukin-6) などが発がんを促進するという報告がある一方で、同じく TNF $\alpha$ 、IL-12 などのサイトカインは発がんを抑制するという報告もある。

炎症シグナル自体が発癌のイニシエーターとなり得るのかを検討するため、TLRs のアダ

プター分子 MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88)に注目した。近年、恒常的活性化型 MyD88 突然変異体がリンパ腫の原因遺伝子の一つとして同定されており、またいくつかのがんでは MyD88 の発現が亢進している。そこで、変異型 MyD88 を細胞に発現させ解析を行った。この細胞では NF- $\kappa$ B を含む MyD88 の下流シグナルの活性化が確認され、さらに糖代謝の亢進が認められた。糖代謝の亢進はがん細胞で見られる代謝の特徴である。この MyD88 発現細胞はヌードマウスにおいて腫瘍を形成することから、変異型 MyD88 がリンパ細胞以外においてもがん促進能を持つことを明らかにした。また、MyD88 発現細胞の糖代謝の亢進が何に起因するものなのかを検討したところ、解糖系遺伝子群の転写を制御する低酸素誘導因子 HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ )の発現亢進が認められた。この HIF-1 $\alpha$ を抑制することによって MyD88 発現細胞は腫瘍を形成しなかった。以上より、MyD88 は NF- $\kappa$ B を介して転写因子 HIF-1 $\alpha$ を活性化させることで腫瘍形成を誘導していることを明らかとした (図 a)。

## 2. 炎症部位においてがん抑制機構は正常に働いているのか？

DNA 損傷は常に私達の体で起こっている現象である。活性酸素、紫外線、放射線、化学物質などによって損傷を受けた DNA は DNA 損傷応答によって修復される。また、がん遺伝子の発現によって DNA の異常な増幅が起こった際にも DNA 損傷応答が活性化される事が知られている。DNA が損傷を受けた細胞では、がん抑制因子として知られる p53 が活性化し、細胞周期の停止が起こり DNA 損傷部位の修復が速やかに行われる。また、この損傷が修復できない時はアポトーシスによって細胞自体が排除される。しかし炎症部位で発がんが多く見られる事から、炎症部位では DNA 損傷応答が正常に働いていないのではないかと考えられた。特に、転写因子 NF- $\kappa$ B は IAPs, FLIP, Bcl-xL, Bfl1, survivin など抗アポトーシスに関する分子の遺伝子発現を促進する事が知られているため、炎症部位における NF- $\kappa$ B の活性化が DNA 損傷応答を抑制している可能性が考えられる。そこで、化学的に炎症を誘導したマウスに DNA 損傷刺激を与え解析した。すると炎症組織では p53 の発現には変化がないものの、細胞周期の停止が起こらない上、アポトーシスも抑制されていた (図 b)。今後、詳細にこれらの機構を解明する予定である。

## 一年を振り返って

12 月に研究室が武蔵小杉より千駄木の大学院棟に引っ越しました。新しい環境と綺麗な建物の中で、精進したいと思います。



## 【清水幹容】

癌幹細胞 (Cancer Stem Cells, CSCs) は、腫瘍形成モデルの一つとして提唱されている細胞集団である。1997年に急性骨髄性白血病で初めてその存在が同定され、その後、多くの固形癌にも存在することが報告されてきた。CSCsは腫瘍形成能、自己複製能、薬剤耐性能をもつとされ、近年、癌の転移や再発といった悪性化に対して、CSCsの重要性が指摘されている。よってCSCsの発生を阻止することが出来れば非常に有用な癌治療法となることが期待される。

当研究室は、これまでにグルコース輸送体であるGLUT3の発現が癌を悪性化させることを明らかにしている。おそらく癌微小環境内において、サイトカイン・ケモカイン等の液性因子によりGLUT3の発現が誘導され、解糖系を含むグルコースの代謝を制御することでCSCsの発生に関与すると推測されるが、その分子基盤は不明な点が多い。このような背景から、本研究はGLUT3によるCSCsの制御機構の解明を目的としており、これまでに「炎症性ケモカインIL-8によるGLUT3を介したグルコース代謝制御機構がCSCs機能に重要であること」を明らかにしたので、以下に概要を述べる。

大腸癌細胞 (HCT116) および肺癌細胞 (HCC827) を用いて、CSCsの形成・維持における解糖系関連遺伝子の発現を調べたところ、GLUT3の発現が有意に高いことが示された。また、CSCsに発現しているサイトカイン・ケモカインを網羅的に解析したところ、炎症性ケモカインであるIL-8が特に高発現していることが明らかとなった。IL-8は炎症性の刺激に応じて免疫系の細胞や炎症部位の細胞から分泌される液性因子であり、CXCR1/2受容体を介して様々な遺伝子発現変化と細胞応答を引き起こす(図1)。そのためIL-8の発現は厳密に制御されており、正常な組織では検出できないほど非常に低い。一方でIL-8は、ほぼ全ての固形癌で高発現しており、その発現量は癌の転移や再発、生存率と相関関係があることが報告されている。以上の点から、IL-8はGLUT3の発現を制御することで、CSCsの形成・維持に関与しているのではないかと仮定した。

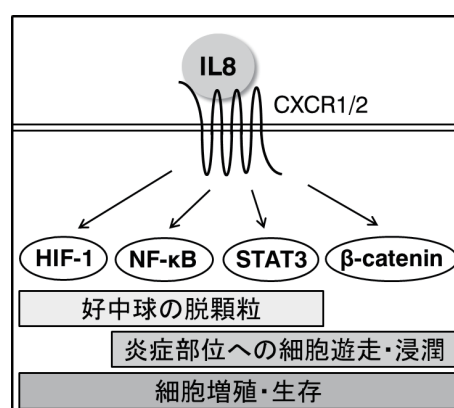


図1：炎症部位でのIL-8による遺伝子誘導と細胞応答

仮説を証明するために解析を行ったところ、大腸癌および肺癌細胞をIL-8で処理することでGLUT3発現誘導とグルコースの取り込み増加、またCSCs形成が促進された。一方、IL-8の発現をshRNAでノックダウンすることでGLUT3発現とCSCs形成が抑制された。このことから炎症性ケモカインIL-8はGLUT3の発現を制御しグルコースの取り込みを調節することでCSCsの形成・維持に関与していることが明らかとなった。興味

深いことに、解糖系の指標となる細胞内 ATP・ピルビン酸・乳酸レベルは IL-8 処理により変化しないことが示され、取り込まれたグルコースは解糖系に使用されていないと推測された。そこで IL-8 処理した際の解糖系以外のグルコース代謝関連遺伝子の発現を調べたところ、解糖系からヘキソサミン経路へと変換する律速酵素である GFAT の発現が誘導されることが明らかとなった。ヘキソサミン経路は、タンパク質への糖付加 (O-GlcNAc 化) を誘導する経路であり、多くの癌の転移や再発と密接に関与している。実際、IL-8 で処理することでタンパク質の O-GlcNAc レベルの増大が確認され、この O-GlcNAc 化が CSCs の形成・維持に必須であり、さらに腫瘍形成能に大きく影響を与えていることが示された。

以上の結果から、癌微小環境内において、IL-8 はグルコース輸送体である GLUT3 と、グルコース消費を解糖系から GlcNAc 合成経路に変換する GFAT の発現を誘導することが示された。これによりグルコース取り込み量の増加と GlcNAc 合成経路の活性化が促進され、最終的にタンパク質の O-GlcNAc 修飾が増大することで CSCs の機能が維持されることが明らかとなった (図 2)。

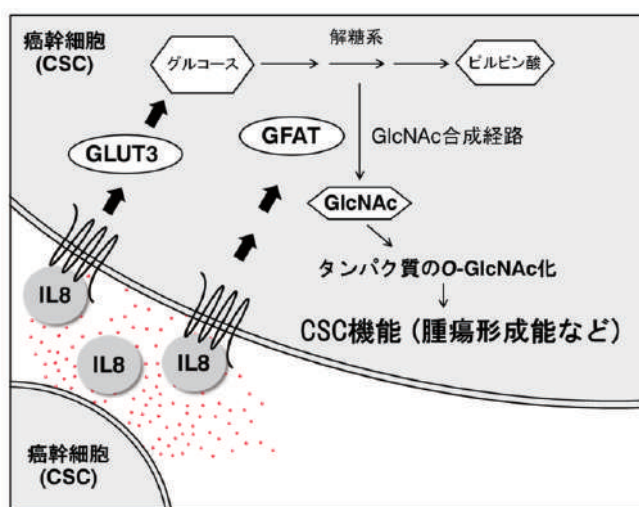


図 2 : IL-8による癌幹細胞(CSC)機能の制御機構

# IV. 生体機能制御学部門

*Department of Bioregulation*

# 生体機能制御学部門

(大学院 生体機能制御学分野)



教授 南 史朗

## 【研究概要】

生体の個体としての機能とその制御機構の解明をめざし、ホルモン・生理活性物質を対象として生理学的研究を行っている。ホルモンの分泌調節、生理作用、細胞内シグナル伝達、さらに動物行動を制御する脳の機構などを研究し、病態の解明と治療法の開発に寄与することを目的とする。

### I. 栄養状態と細胞内シグナリング (豊島、時田、大木)

動物は、栄養状態に応答して物質代謝を変動し、恒常性を維持する巧妙な仕組みを持つ。体内の様々なホルモン分泌を変化させると共に、組織ごとに細胞内のシグナル伝達因子を変動させることで物質代謝を調節すると考えられる。私たちは、タンパク質・アミノ酸栄養状態に着目し、それによって変動するホルモン(インスリン、インスリン様成長因子、成長ホルモン、アディポネクチンなど)の分泌調節機構、およびこれらホルモンの細胞内シグナル伝達系を介した代謝調節機構の解明を目指している。

#### 1) インスリン受容体基質を介した代謝調節機構の解明

インスリン受容体基質(IRS)-2は、インスリンやインスリン様成長因子(IGF)-Iのシグナルを伝達する重要な分子である。これまでに、哺乳類におけるIRS-2の生理機能は主にマウスで明らかにされており、IRS-2は糖代謝やインスリン作用の調節に重要な役割を果たす分子と考えられている。今回、我々は、マウスと同様にモデル動物として汎用されているラットにおけるIRS-2の生理的役割を明らかにするために、CRISPR/Cas9システムによって全身でIRS-2を欠損させたラットを作製し、その表現型を解析した。その結果、IRS-2欠損ラットは成長遅滞を起した。また、耐糖能は正常であり、さらに、特に雄性IRS-2欠損ラットのインスリン感受性は野生型と比べて亢進しており、肝臓におけるmTORC1経路のインスリン依存的な活性化も増大していた。以上の結果から、ラットにおいて、IRS-2は糖代謝の調節には関与せず、正常な成長を促すのに重要な分子であることが明らかとなった。

また、同じ技術を利用してIRS-1欠損ラットの作出にも成功し、今後その表現型を解析していく予定である。

### II. マウスの養育行動の神経回路の解析 (折笠、加藤、勝又)

本研究の目標は、養育行動関連の神経回路の特定を行い、その回路発現に関わる分子基盤を明らかにすることにある。私たちは、飼育環境の違いによって雄マウスによる仔への養育行動が変化することを示し、雄による仔への行動反応を定量化する手法を見いだしている(Orikasa *et al.* *Physiol Behav* 2015)。雌雄の養育行動を制御する遺伝子の候補としてメラニン凝集ホルモン(MCH)を、*cfos*発現を指標にして検討し、養育行動の違いによる発現の差が認められた(論文発表準備中)。MCHノックアウトによる効果を検討し、出産後の仔の生存数減少が、仔を養育するための抱え込み行動が減少することにより引き起こされたと考察し、養育行動を担う重要なホルモンであると結論づけた。さらにMCH-Creリコンビナーゼトランスジェニックマウスを用いた、MCHニューロン特異的な行動解析をDREADD法及び、オプトジェネティクス解析により検討を行い一定の成果を得、現在論文投稿の最終段階に入っている。



### III. メタボリック症候群の糖・脂質代謝系の分子機構の研究（八木、矢野）

糖尿病や脂肪肝などの代謝異常は、医学的・社会的に重大な問題である。私たちは、栄養状態の変化に対応する肝における糖・脂質代謝異常の機序を解明するために、国際医療センター分子代謝制御研究部（松本道宏博士）と共同研究を行い、脂肪合成酵素 FAS および絶食シグナルで誘導される分子 DIOX3 などに焦点をあてて研究を進めてきた。

#### 1) 肝細胞の糖代謝におけるプロリン水酸化酵素（PHD3）の病態生理的意義

2型糖尿病では肝臓におけるインスリンの作用不全によって肝糖新生が過剰に亢進し、慢性高血糖を引き起こす原因となる。肝糖新生の抑制は病態に基づく2型糖尿病の治療戦略となりうることから、肝糖新生の分子メカニズムの解明は重要な課題である。これまでに絶食時に発現が誘導される新たな肝糖新生促進因子として CITED2 を同定し、CITED2 と協調的に発現が制御される遺伝子を cDNA マイクロアレイによって網羅的に解析したところ、低酸素誘導因子 HIF のプロリン水酸化酵素 3 (PHD3) が得られた。そこで、初代培養肝細胞を用い、shRNA によって PHD3 をノックダウンし、PHD3 の機能解析を行った。絶食シグナルであるグルカゴン刺激により、糖新生系酵素の発現は減少し糖産生量も抑制された。摂食時のシグナルであるインスリン刺激では、インスリンシグナルが抑制された。このことから PHD3 はインスリンシグナルを維持する役割を持つことが示唆された。次に、炎症応答について検討したところ、PHD3 をノックダウンすると NFκB や JNK のリン酸化は亢進し、TNFα をはじめとする炎症関連因子の遺伝子発現が亢進した。以上の結果より、PHD3 は糖新生に重要な役割を果たすのみならず、炎症応答の抑制に寄与することによってインスリンシグナルの維持に重要な役割を果たしていることが解った。

#### 2) 高血糖緊急症にみられる一過性脂肪肝の病態について

非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis：NASH）の一部は肝硬変・肝臓癌に進展することから病態解明は急務である。肝臓に脂肪酸が流入することによる肝脂肪蓄積の他に、グルコースからの内因性脂肪酸合成（*de novo* lipogenesis：DNL）、肝臓での脂肪酸酸化の低下・VLDL の分泌低下などの由来が提唱されているが不明な点が多い。インスリン分泌の絶対的・相対的低下による高血糖を呈する高血糖緊急症において一過性の脂肪肝を認める症例がみられることから、血糖をはじめとする臨床パラメータと脂肪肝・肝機能障害との関連を症例の蓄積を通じて解析をおこなっている。

### IV. 成長ホルモンの新たな生理作用と作用機序（中田、南）

成長ホルモン（GH）は雄ラットでは3時間ごとに分泌されるのに対し雌では不規則に分泌される。この分泌リズムの違いが様々な遺伝子発現の雌雄差を作っていることが知られているが、その機序や意義はよく解明されていない。私たちは、ラット GH 分泌の雌雄差をマーカーとして GH の新たな生理作用を検討してきた。

1) AKR1D1 はステロイド核の4位の二重結合を還元する酵素であり、ステロイドホルモンの代謝や胆汁酸の合成に働く。ラット肝の AKR1D1 の mRNA・タンパク量には雌雄差があり、GH 依存的に変動することを明らかにした。また、AKR1D1 と異物を認識する核受容体 CAR の mRNA 量に相関があることから、GH の肝におけるステロイド代謝調節機序の解明、および異物認識（解毒作用）機序の解明につながると期待される。

### V. インスリン様成長因子（IGF）-I を介さない成長ホルモン（GH）の直接作用の検討（石川）

GH の細胞情報伝達経路のうち、IGF-I 産生を促す JAK2-STAT 経路ではなく、Src-Erk 経路を介する作用、つまり IGF-I を介さない作用について研究している。

#### 1) 免疫に関与する作用

母児接点にある絨毛細胞は non-classical major histocompatibility class I の一種である HLA-G が

表出されており、この HLA-G を natural killer (NK) 細胞のキラー細胞抑制レセプターが認識し、NK 細胞の攻撃から免れている。我々は以前、GH は Src-Erk 経路を介し、肝部分切除後の残存肝で HLA-G の発現を増加させることを解明した。そしてこの研究結果から、成長ホルモン受容体が発現している胎盤の絨毛細胞に対し、胎盤性成長ホルモン (pGH) が妊娠継続に必要とされている HLA-G の発現を調節しているのではないかという仮説をたてた。絨毛細胞を pGH で刺激をすると HLA-G の mRNA 発現が増加することがわかってきている。

#### 2) 小胞体ストレスに関与する作用

小胞体ストレスに関与する因子として小胞体でのフォールディング能力を高めるとされる X-Box binding protein-1 (XBP-1) が知られている。GH は膵  $\beta$  細胞細胞株である BRIN-BD11 において Src-Erk 経路を介し、XBP-1 の発現を増加させた。また正常ラットの膵島では  $\alpha$ 、 $\beta$  双方の細胞で抗 XBP-1 抗体に陽性の細胞が見られたが、GH 単独欠損のある自然発祥矮小ラット (SDR) の膵島では、抗 XBP-1 抗体に陽性の細胞が減少していた。

#### 3) 動脈硬化に関与する作用

GH は Src-Erk 経路を介し HUVEC における VCAM-1、E-selectin といった接着因子の mRNA 発現を増加させた。また HUVEC と血液から分離した単球を co-culture すると、GH で刺激した場合には HUVEC に対し THP-1 あるいは単球の接着が増加し、その作用は MEK1/2 阻害剤にて抑制された。これらの結果から GH は IGF-I を介さず、Src-Erk 経路の細胞伝達経路を介して、接着因子を増加させ動脈硬化進展に関与している可能性を考えた。

## 【研究業績】

### < 原著 >

1. Mushiroda T, Takahashi Y, Omura T, Yamamoto Y, Kamei T, Hoshida T, Takeuchi K, Otsuka K, Okazaki M, Watanabe M, Kanemoto K, Odshima T, Watanabe A, Minami S, Saito K, Tanii H, Shimo Y, Hara M, Saito S, Kinoshita T, Kato M, Yamada N, Akamatsu N, Fukuchi T, Ishida S, Yasumoto S, Takahashi A, Ozeki T, Furuta T, Saito Y, Izumida N, Kano Y, Shiohara T, Kubo M. Association of HLA-A\*31:01 screening with the incidence of carbamazepine-induced cutaneous adverse reactions in a Japanese population. *JAMA Neurology* 75(7): 842-849, 2018.
2. Nishi H, Yamanaka D, Kamei H, Goda Y, Kumano M, Toyoshima Y, Takenaka A, Matsuda M, Nakabayashi Y, Shioya R, Kataoka N, Hakuno F, Takahashi S. Importance of Serum Amino Acid Profile for Induction of Hepatic Steatosis under Protein Malnutrition. *Sci Rep*, 8, 5461, 2018.
3. Yano H, Sakai M, Yagi T, Naganuma T, Matsukawa T, Mitsushima M, Iida S, Inaba Y, Inoue H, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Asahara S, Kido Y, Minami S, Kasuga M, Matsumoto M. PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signaling in hepatocytes. *Sci Rep* 8: 14290, 2018.

### < 学会発表 >

(国際学会)

1. Toyoshima Y, Nakamura K, Tokita R, Taguchi Y, Teramoto N, Sugihara H, Kato H, Yamanouchi K, Minami S. Insulin receptor substrate-2 knockout rats generated by CRISPR/Cas9-mediated genome editing exhibit growth retardation. Asia Pacific Nutrigenomics Organization (APNNO) 2018 Biennial Conference, Dec 2018, Tokyo, Japan
2. Orikasa C, Kondo Y, Katsumata H, Minami S. Social isolation facilitates maternal care in both sexually naïve male and female ddN mice. 9th International Congress of Neuroendocrinology in Toronto, Ontario, Canada, July 15-18, 2018.

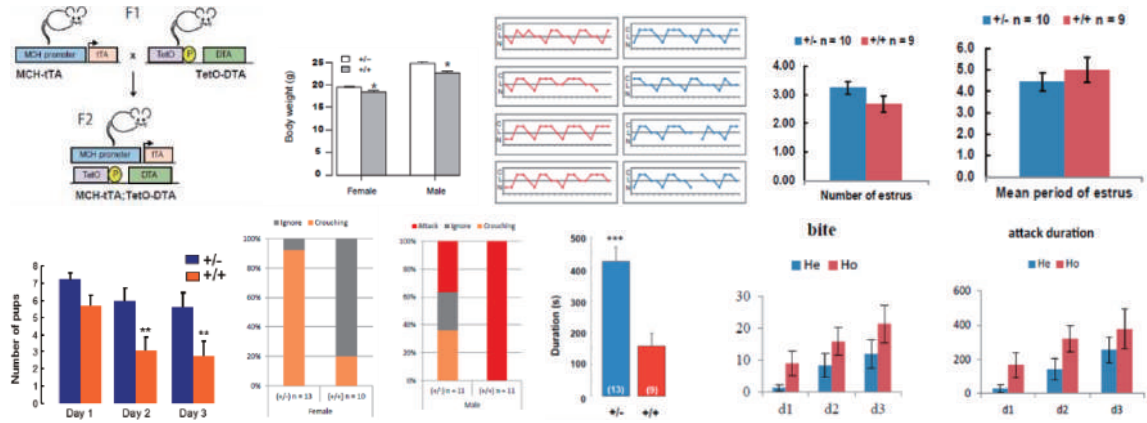
(国内学会)

1. 八木 孝、豊島由香、時田玲子、田口雄亮、南 史朗。低タンパク質食給餌ラットにおける血中アディポネクチン増加機構の解明。第91回日本内分泌学会学術総会、宮崎、2018年4月、宮崎
2. 渡辺 充、八木孝、石川真由美、南 史朗。誘因不明な高血糖昏睡の高齢患者が病理解剖により膵癌と診断された一例。第642回日本内科学会関東支部関東地方会、2018年4月、東京
3. 浅井聡子、八木 孝、許田典男、塩田美桜、草薙麻莉奈、丸山雄二、石川真由美、南 史朗。剖検にて多発骨髄腫が明らかとなったPTHrP高値を伴う高カルシウム血症の1例。第644回日本内科学会関東支部関東地方会、2018年4月東京
4. 八木 孝、大槻昌子、佐々木佳枝、金子佳世、福永ヒトミ、石川真由美、杉原 仁、南 史朗。劇症1型糖尿病発症時に一過性の高度脂肪肝を合併した2症例。第61回日本糖尿病学会年次集会、2018年5月、東京
5. 田口雄亮、豊島由香、時田玲子、加藤久典、伯野史彦、高橋伸一郎、南 史朗。低タンパク質食摂取によるインスリン様成長因子(IGF)抵抗性発生機構の解析。第72回日本栄養・食糧学会大会、2018年5月、岡山
6. 石川真由美、八木 孝、弘世貴久、杉原 仁、南 史朗。長期の成長ホルモン補充療法による糖代謝への影響。第28回臨床内分泌代謝 Update、2018年11月、福岡
7. 赤須東樹、赤須東樹、八木 孝、石川真由美、杉谷 巖。術前管理に難渋した2例のバセドウ病から学んだこと。日本内分泌・甲状腺外科学会雑誌 35 (Suppl.2) s344, 2018.

## 【研究紹介】

生体機能制御学部門  
准教授 折笠千登世

### マウス養育行動における神経基盤の解明



**メラニン凝集ホルモン(MCH)の機能的欠損が子育て行動にどのような影響を及ぼすか**  
(背景) MCH は摂食・エネルギー代謝・睡眠・不安様行動・認知などにかかわる神経修飾の生理機能に参与している。本研究では MCH の養育行動の関連性について明らかにする。

(実験) MCH ノックアウトマウス(KO) (図 A) を作成し子育て行動に対する影響を調べた。

(結果) MCHKO によって、体重減少に対する効果があり、雌雄共に有意な減少が認められた (図 B)。雌の生殖機能を明らかにする目的で膣腔周期を検討したところ影響はなかった (図 C, D, E)。しかし、MCHKO により出産後の仔の生育に対する効果が認められ、生後 2 日目から仔の生存数が有意に減少することが明らかとなった (図 F)。仔マウス提示による養育行動の解析より、雌ではノックアウトにより無視行動が、オスでは喰殺行動が有意に上昇した (図 G)。さらに雌の仔に対する抱え込み行動が有意に減少した (図 H)。雄の成人他個体に対する攻撃行動は、ノックアウトで有意に上昇していた (図 I)。

## 結語

養育行動には性差があり、雌に特有の行動であるとされている。雄マウスではこのような養育行動を示すことはむしろ稀であり、仔への攻撃行動(喰殺行動)を示すことがよく知られている。しかし、先行研究において雄マウスにおいても、飼育環境の変化によって、養育行動の促進が認められることを明らかにした<sup>1,2</sup>。本研究では雌雄ともに、養育行動の促進において共通の神経基盤があるかどうかを明らかにすることを目的とし、今回その候補として MCH の検討を行った。MCH 欠損によって雄での喰殺行動がほぼすべてのノックアウトマウスで現れた事は、仔への攻撃行動を制御する因子である可能性を示唆していた。また出産後の仔の生存数減少は、仔を養育するための抱え込み行動が減少する影響が考えられ、養育行動を担う重要なホルモンであると結論することが出来る。今後他の手法を駆使し解析を行いさらに MCH の養育行動との関連性を明らかにしていく。

## 主要論文

1. Orikasa C, Kondo Y, Katsumata H, Terada M, Akimoto T, Sakuma Y, Minami S “Vomeronasal signal deficiency enhances parental behavior in socially isolated male mice” *Physiol Behav* 168: 98-102 (2017)
2. Orikasa C, Nagaoka K, Katsumata H, Sato M, Kondo Y, Minami S, Sakuma Y “Social isolation prompts maternal behavior in sexually naïve male ddN mice” *Physiol Behav*.151; 9-15 (2015)
3. Orikasa C & Sakuma Y “Estrogen configures the sexual dimorphism in the preoptic area of different strain of mice” *The Journal of Comparative Neurology*, 518; 3618-3629 (2010)





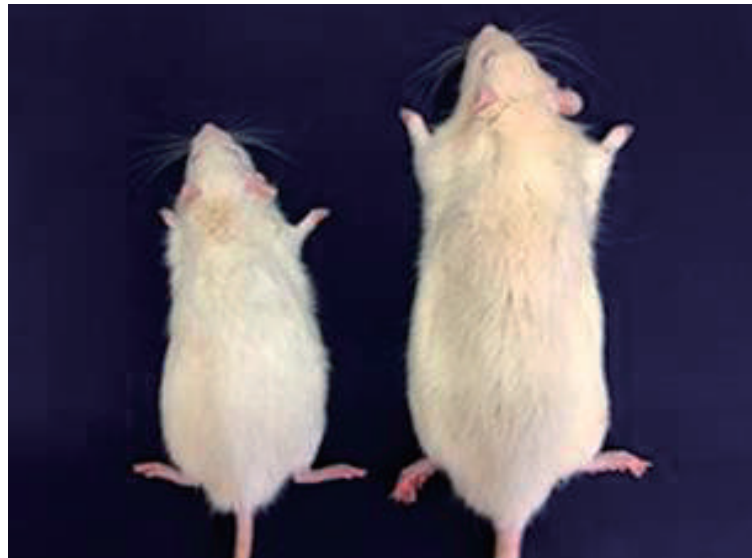
生体機能制御学部門  
講師 豊島 由香

## タンパク質・アミノ酸栄養状態に応答した代謝調節機構の解明

### 略歴

2002年 東京大学  
大学院農学生命科学  
研究科修了 農  
学博士  
2002年 米国 NIH,  
NIDDK, Diabetes  
Branch.  
Postdoctor  
2005年 日本学術  
振興会特別研究員  
2008年 日本医科  
大学先端医学研究  
所助教  
2014年より現職

座右の銘：失敗は  
成功のもと・人事  
を尽くして天命を  
待つ



ゲノム編集によって作成した IRS-1 欠損ラット  
IRS-1 欠損ラットは、顕著な成長障害が観察された。

動物は、食事から栄養素を摂取する。食事内容によって栄養状態は変動し、それに応じて代謝を適切に調節し、生体恒常性を維持している。これを代謝調節機構といい、その種類は栄養状態に応じて多岐に渡るが、詳細は未知な部分が多い。私たちは、栄養素のうち、タンパク質・アミノ酸に着目し、タンパク質・アミノ酸栄養状態に応じた代謝調節機構の解明を目指している。

これまでに私たちは、タンパク質・アミノ酸栄養状態に応答して、インスリンの分泌や活性が変化することを見出してきた。特に、低タンパク質栄養状態では、インスリンの分泌量は低下するのにもかかわらず、肝臓や骨格筋におけるインスリン感受性が亢進することを明らかにした。さらに、低タンパク質栄養状態の肝臓では、インスリンの細胞内シグナル因子である、インスリン受容体基質 (IRS) -2 と翻訳抑制因子 4E-BP1 の量が増加し、中性脂肪量 (TG) が顕著に増加することがわかってきた。

これらの知見に基づき、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入やゲノム編集によって作製した遺伝子改変動物を用いて、以下の点を検討している。

- ・ 低タンパク質栄養によるインスリン活性増強の生理的意義
- ・ 低タンパク質栄養による血中アディポネクチン増加機構
- ・ 低タンパク質栄養による肝臓 4E-BP1 増加が肝臓脂質蓄積に果たす役割
- ・ 低タンパク質栄養によるエネルギー消費亢進機構
- ・ 低アミノ酸栄養状態における IRS の生理機能

昨年度は、IRS-2 欠損ラットの表現型解析を中心に行うとともに、IRS-1 欠損ラットの作出にも成功した。

### 最近の論文

1. Hiroki Nishi, Daisuke Yamanaka, Hiroyasu Kamei, Yuki Goda, Mikako Kumano, **Yuka Toyoshima**, et al. Importance of Serum Amino Acid Profile for Induction of Hepatic Steatosis under Protein Malnutrition. *Sci Rep*, 8, 5461, 2018.
2. Taguchi Y, **Toyoshima Y\***, et al. Triglyceride synthesis in hepatocytes isolated from rats fed a low-protein diet is enhanced independently of upregulation of insulin signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 490(3): 800-805, 2017. **\*Corresponding Author**





生体機能制御学部門 (武蔵小杉病院 内分泌・糖尿病・動脈硬化内科)  
講師 石川 真由美

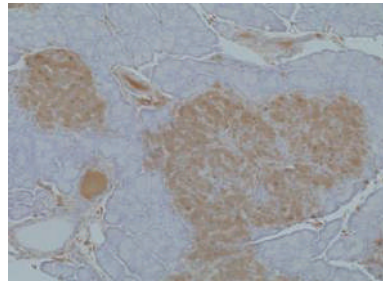
## インスリン様成長因子-I を介さない成長ホルモンの直接作用の検討

### 略歴

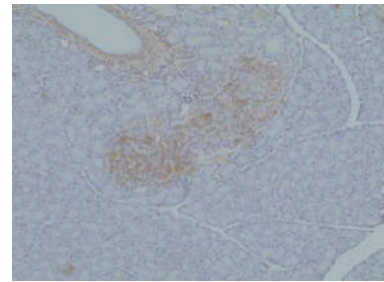
1994年 東邦大学  
医学部卒業  
2001年 医学博士  
2007年 オーストラリア  
クイーンズランド大学留学  
2009年 東邦大学  
大森病院 糖尿病  
代謝内分泌科助教  
2014年 日本医  
科大学武蔵小杉病  
院内科

臨床医であることを  
生かし、臨床に  
結びつくような研  
究を行っていきたく  
い。

A. 12ヶ月齢の正常ラットの膵島  
(抗 XBP-1 抗体で染色)



B. 12ヶ月齢のSDRの膵島  
(抗 XBP-1 抗体で染色)



### 正常ラットと GH 単独欠損のある自然発症矮小ラット (SDR) の膵島における 抗 XBP-1 抗体に陽性の細胞。

抗 XBP-1 抗体を用いた免疫染色をしたところ、陽性細胞のほとんどが膵島にあった。12ヶ月の正常ラットの膵島では SDR と比較し、より陽性細胞が多く認められる傾向があった (Bar : 50  $\mu$ m)。

成長ホルモン(GH)の細胞内情報伝達経路には二つあり、一つは JAK2-STAT 系を介しインスリン様成長因子-I (IGF-I) の産生を促す作用と、二つ目は JAK2 を介さず src-erk 系を介する作用、つまり IGF-I を解さない作用を持つ。この src-erk 系を介する作用について主に研究をおこなっている。

### 免疫系に關与する作用

母児接点にある絨毛細胞は non-classical major histocompatibility class I の一種である HLA-G が表出されており、この HLA-G を natural killer(NK)細胞のキラー細胞抑制レセプターが認識し、NK 細胞の攻撃から免れている。GH はこの HLA-G の発現を、肝部分切除後の残存肝で増加させることを解明した(Ishikawa M, et al. The 5th International Congress of the GRS and the IGF society. New York. Oct 2010.)。胎盤性 GH が絨毛細胞の HLA-G の mRNA 発現を増加させることがわかり、妊娠の維持に必要な免疫学的寛容の獲得に關与する可能性がある。また GH は乳癌における HLA-G の mRNA 発現も増加させることがわかり、腫瘍が免疫担当細胞からの攻撃から免れる機序の一つであると考えている。

### 小胞体ストレスに關与する作用

小胞体ストレスに關与する因子として小胞体でのフォールディング能力を高めるとされる X-Box binding protein -1 (XBP-1)が知られている。正常ラットの膵島では  $\alpha$ 、 $\beta$  双方の細胞で抗 XBP-1 抗体に陽性の細胞が見られたが、GH 単独欠損のある自然発症矮小ラット (SDR) の膵島では、抗 XBP-1 抗体に陽性の細胞が減少していた。

### 主要論文

3. **Ishikawa M, et al.** Comparison of the somatogenic action of 20KDa- and 22KDa-human growth hormones on spontaneous dwarf rats. *Growth Horm IGF Res.* 2000. 10: 199-206.
4. **Ishikawa M, et al.** A novel specific bioassay for serum human growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000. 85: 4274-4279.
5. **Ishikawa M, et al.** Metabolic effects of 22KDa- and 20KDa-human growth hormone on adult male spontaneous dwarf rats. *Eur J Endocrinol.* 2001. 145: 791-797.



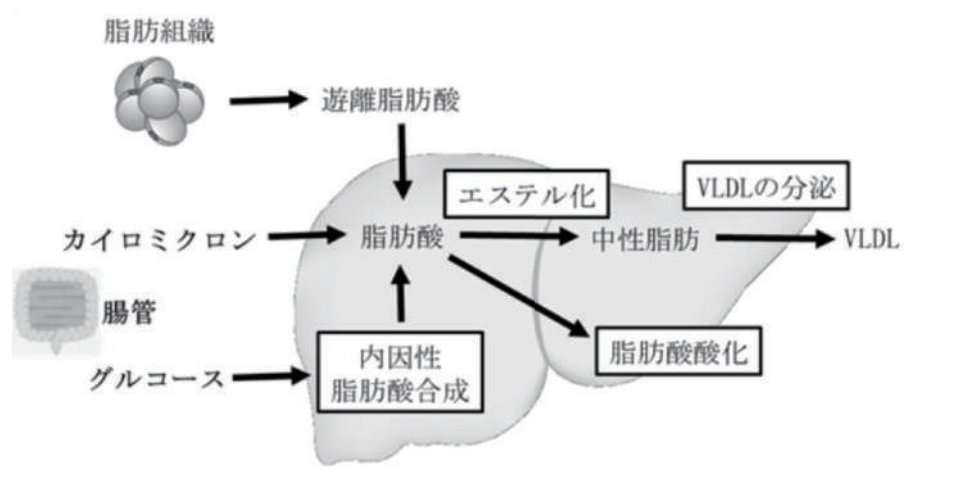
生体機能制御学部門（武蔵小杉病院 内分泌・糖尿病・動脈硬化内科）  
大学院生 八木 孝

## 高血糖緊急症発症時における脂肪肝の病態解明

### 略歴

2008年 日本医科大学卒業

患者さんの治療につながる研究に取り組みたい。



### 脂肪肝の由来

肝臓での中性脂肪蓄積の原因として流入因子として血中脂肪酸の増加やグルコースからの内因性脂肪酸合成が、流出因子としてVLDL分泌の低下や脂肪酸酸化の低下があげられる。

非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis：NASH）の一部は肝硬変・肝臓癌に進展することから病態解明は急務である。肝臓に脂肪酸が流入することによる肝脂肪蓄積の他に、グルコースからの内因性脂肪酸合成（*de novo* lipogenesis：DNL）、肝臓での脂肪酸酸化の低下・VLDLの分泌低下などの由来が提唱されているが不明な点が多い。インスリン分泌の絶対的・相対的低下による高血糖を呈する高血糖緊急症において一過性の脂肪肝を認める症例がみられることから、血糖をはじめとする臨床パラメータと脂肪肝・肝機能障害との関連を症例の蓄積を通じて解析をおこなっている。

### 主要論文

1. Sakai M, Tujimura-Hayakawa T, **Yagi T**, Yano H, Mitsushima M, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Inoue H, Kido Y, Kasuga M, Matsumoto M. The GCN5-CITED2-PKA signalling module controls hepatic glucose metabolism through a cAMP-induced substrate switch. *Nat Commun.* 2016. 7: 13147.
2. Kobayashi K, Tanaka T, Okada S, Morimoto Y, Matsumura S, Manio MC, Inoue K, Kimura K, Yagi T, Saito Y, Fushiki T, Inoue H, Matsumoto M, Nabeshima Y. Hepatocyte  $\beta$ -Klotho regulates lipid homeostasis but not body weight in mice. *FASEB J.* 30 : 849-862, 2016

生体機能制御学部門

助教 中田朋子

### 成長ホルモンの新たな生理作用と機序

#### 略歴

大阪大学大学院理  
学研究科修了(理  
学博士)

主に GH の作用に  
ついて研究してい  
る。

成長ホルモン(GH) は筋肉や骨など様々な組織で働き、標的細胞の増殖、分化、代謝を調節している。GH 受容体はサイトカイン受容体ファミリーに属し、JAK-STAT 系を活性化し、c-fos 等の発現を誘導する。また、GH は雄ラットでは 3 時間ごとに分泌されるのに対し雌では不規則に分泌される。この分泌リズムの違いが様々な遺伝子発現の雌雄差を作っていることが知られているが、その機序は未だ不明な点が多い。これまでに私たちは、GH が作用する主要な組織である肝臓で GH によって早期に発現誘導される新たな遺伝子を検索し、その発現調節機構と作用を検討してきた。そして雄ラットの肝臓では小胞体ストレスで活性化される転写因子 X-box binding protein 1 (XBP1) の mRNA およびタンパク量が GH によって調節され、シャペロン発現を誘導すること、Xbp1 mRNA 発現には GH によってリン酸化される転写因子が関与していることなどを明らかにした。また、ラットの肝臓に於いて、ステロイド核の 4 位の二重結合を還元する酵素でステロイドホルモンの代謝や胆汁酸の合成に働くことが知られているタンパクの量と mRNA に雌雄差があること、それらは GH によって調節されることを明らかにした。GH の作用は多様であり、新たな生理作用について検討を重ねている。

# **V. タンパク質間相互作用学部門 (社会連携講座)**

*Department of Protein-protein Interaction Research*

# タンパク質間相互作用学部門（社会連携講座）

教授 浜窪 隆雄

## 【研究概要】

本社会連携講座では、血管と炎症および感染症とのかかわりにおける分子機構について、タンパク質間相互作用の解析から全く新しい治療法の開発につなげることを目標とする。対象とする研究が、一般的な生化学的アプローチと異なる点を列挙すると、

- (i) タンパク質相互作用阻害（protein-protein interaction inhibitor : PPI）であること  
従来の創薬は酵素学を基本として、酵素タンパク質の活性中心をブロックする阻害剤の開発が中心的であった。これに対して PPI は、タンパク質間あるいはタンパク質と核酸等の分子間相互作用面に介入し、相互作用を阻害して反応を抑制する。
- (ii) 天然変性タンパク質（intrinsically disordered protein : IDP）であること  
酵素や受容体などのタンパク質は、一定の立体構造を保って機能する。一方、近年、シグナル伝達のハブとなるタンパク質は、決まった構造をとらない天然変性部位を持つことがわかってきた。これらのタンパク質は、相互作用により構造が変わる。
- (iii) 相互作用の構造変化を動的にとらえる必要があること  
酵素-基質間の相互作用は、活性中心の結晶構造解析が有用である。しかし、IDP の場合結晶が得られないことや、相互作用部位が複数箇所あり、しかも時間的構造変化を伴うことなど、これまでの酵素解析法ではわからないことが多い。コンピュータシミュレーションや熱量測定、動的光散乱などを用いる必要があり、また新規測定法の開発も視野に入れる必要がある。  
などが挙げられる。

具体的な研究内容は次の2つである。

### (1) ペントラキシン3 (PTX3) の生体防御反応の解析と敗血症治療薬の開発

PTX3 は自然免疫反応の液性パターン認識受容体として知られている。急性炎症時には、病変部位に集まった好中球から放出され、抗菌作用や補体活性化、貪食細胞活性化作用等を有する。創傷治癒の過程では、IaI (inter-alpha-trypsin inhibitor)、ヒアルロン酸、TSG6 などと複合体を作り、細胞外マトリックスを形成する。同時に FGF (fibroblast growth factor) を介した新生血管の増生や繊維芽細胞を活性化する役割がある。

我々は、敗血症患者血液中の PTX3 複合体を調べ、上記タンパク質の他に、好中球 NETs (Neutrophil extracellular traps) に起因するタンパク質群を同定した。NETs は Brinkmann らにより 2004 年に提唱された好中球自身のクロマチンからなる抗菌性構造物であり、生体防御反応の仕組みである。その主成分であるヒストンは細胞傷害性を示し、特に血管内皮細胞が障害をうけることによって、微小血栓形成により臓器傷害に至ると考えられる。この時、PTX3 はヒストンを凝集し、細胞傷害性を抑制することを見出した。

- 1) 本年度は、PTX3 とヒストンの相互作用について、タンパク質の凝集反応を評価するため、DLS (動的光散乱法) と FT-IR (赤外線分光法) の有用性を認めた。また、ヒストンの血管内皮細胞障害活性に対する PTX3 部分ペプチドによる抑制作用を確認し、ペプチド安定性を図るプロジェクトを開始した。



- 2) 小児血管炎である川崎病と PTX3 の関連について、重症度判定の血液マーカーとなる可能性を見出しているが、病態における役割について東京薬科大大野尚仁教授の開発した CAWS (カンジダ培養上清) による動脈炎モデルを解析するプロジェクトに着手した。
- 3) ヒストンの血管内皮細胞傷害性について、候補部位を特定し、細胞傷害時に放出されるペプチドについて解析を行った。

(2) WTAP (Wilms' tumor 1-associating protein) によるオルタナティブスプライシング機構の解明  
 WTAP は小児ウィルムス腫瘍の原因遺伝子として同定された WT-1 に相互作用するタンパク質として当初報告された。我々は、全く別のアプローチにより、血管内皮細胞の細胞周期を制御するタンパク質として同定報告した。その機構としてサイクリン A2 遺伝子の mRNA の安定性を制御していることをつきとめた。その後、アデノシンメチル化 (m6A) 酵素との相互作用や、複数のタンパク質やノンコーディング RNA と複合体を形成し、核内スペckルと呼ばれる核内微小構造において、オルタナティブスプライシングに関わっていることを報告してきた。現在では、WTAP はアデノシンメチル化を通して、広く細胞分化、癌化、ウイルス感染などに重要な役割を果たしていると考えられている。

- 1) 本年度は、HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) の RNAseq により WTAP 依存的にオルタナティブスプライシングが起こる遺伝子を 4 種類同定し、スプライシング機構について解析を行った。
- 2) WTAP は天然変性部位を含み、また重合体形成、核酸結合など相互作用形式が複雑で精製が困難である。部分長の精製法を試み、HDX (重水素置換 MS 解析) を用いた反応面の解析プロジェクトを開始した。

## 平成 30 年度研究実績

### < 原著論文 >

1. Jiang S, Hamakubo T, Mitsui K, Yagami R, Fujiyoshi Y, Ajioka Y, Naito M., Roundabout1 distribution in neoplastic and non-neoplastic diseases with a focus on neoangiogenesis, *Int J Clin Exp Pathol*, 2018; 11(12)
2. Yamashita T, Mizohata E, Nagatoishi S, Watanabe T, Nakakido M, Iwanari H, Mochizuki Y, Nakayama T, Kado Y, Yokota Y, Matsumura H, Kawamura T, Kodama T, Hamakubo T, Inoue T, Fujitani H, Tsumoto K Affinity Improvement of a Cancer-Targeted Antibody through Alanine-Induced Adjustment of Antigen-Antibody Interface. *Structure*. 2019 Mar 5;27(3):519-527.
3. Asada H, Horita S, Hirata K, Shiroishi M, Shiimura Y, Iwanari H, Hamakubo T, Shimamura T, Nomura N, Kusano-Arai O, Uemura T, Suno C, Kobayashi T, Iwata S. Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog. *Nat Struct Mol Biol*. 2018 Jul;25(7):570-576.
4. Tashima T, Nagatoishi S, Caaveiro JMM, Nakakido M, Sagara H, Kusano-Arai O, Iwanari H, Mimuro H, Hamakubo T, Ohnuma SI, Tsumoto K. Molecular basis for governing the morphology of type-I collagen fibrils by Osteomodulin. *Commun Biol*. 2018 Apr 19;1:33.
5. Akiba H, Ikeuchi E, Ganbat J, Fujikawa H, Arai-Kusano O, Iwanari H, Nakakido M, Hamakubo T, Shimomura Y, Tsumoto K. Structural behavior of keratin-associated protein 8.1 in human hair as revealed by a monoclonal antibody. *J Struct Biol*. 2018 Nov;204(2):207-214.
6. Miyanabe K, Yamashita T, Abe Y, Akiba H, Takamatsu Y, Nakakido M, Hamakubo T, Ueda T, Caaveiro JMM, Tsumoto K. Tyrosine Sulfation Restricts the Conformational Ensemble of a Flexible Peptide, Strengthening the Binding Affinity for an Antibody. *Biochemistry*. 2018 Jul 17;57(28):4177-4185.

7. Miyanabe K, Akiba H, Kuroda D, Nakakido M, Kusano-Arai O, Iwanari H, Hamakubo T, Caaveiro JMM, Tsumoto K. Intramolecular H-bonds govern the recognition of a flexible peptide by an antibody. *J Biochem.* 2018 Jul 1;164(1):65-76.
8. Kobayashi M, Ohsugi M, Sasako T, Awazawa M, Umehara T, Iwane A, Kobayashi N, Okazaki Y, Kubota N, Suzuki R, Waki H, Horiuchi K, Hamakubo T, Kodama T, Aoe S, Tobe K, Kadowaki T, Ueki K. The RNA Methyltransferase Complex of WTAP, METTL3, and METTL14 Regulates Mitotic Clonal Expansion in Adipogenesis. *Mol Cell Biol.* 2018 Jun 4.
9. Horiuchi K, Perez-Cerezales S, Papasaikas P, Ramos-Ibeas P, López-Cardona AP, Laguna- Barraz R, Fonseca Balvís N, Pericuesta E, Fernández-González R, Planells B, Viera A, Suja JA, Ross PJ, Alén F, Orio L, Rodríguez de Fonseca F, Pintado B, Valcárcel J, Gutiérrez-Adán A. “Impaired Spermatogenesis, Muscle, and Erythrocyte Function in U12 Intron Splicing-Defective Zrsr1 Mutant Mice.” *Cell Rep.* 2018 Apr 3;23(1):143-155.

### < 学会発表 >

1. 堀内恵子 他 “WTAP タンパク質はヒストンメチル化酵素のオルタナティブスプライシング、ポリアダニレーションを制御する” 第41回日本分子生物学会（横浜）
2. 早田敬太、川村猛、福田哲也、坂東泰彦、浜窪隆雄、「血管内皮細胞傷害により生じるベジクルの膜タンパク質プロテオミクス」、第15回日本臨床プロテオゲノミクス研究会（2019年5月11日、東京）
3. 加藤治文、浜窪隆雄 “Next generation Targeted Photodynamic Therapy (NG-PDT)“ Photodynamic Therapy and Photodiagnosis Update 2018 コッヘルアムゼー（ドイツ）
4. Ohba A, Soda K, Hamakubo T, et al., Laboratory-size X-ray Microscope using Wolter Mirror Optics and an Electron-impact X-ray Source for Multi-energy Observation X線顕微鏡学会(XRM2018)(カナダ)
5. K. DAIGO, D. MORONE, S. VALENTINO, M. SIRONI, F. PETRONI, A. DONI, A. INFORZATO, B. BOTTAZZI, A. MANTOVANI, “Synergistic action of soluble-pattern recognition molecule pentraxin 3 (PTX3) with myeloperoxidase (MPO) -mediated bacteria killing”, 5th European Congress of Immunology (September, 2018, Amsterdam, Nederland)

### < 招待講演 >

1. 浜窪隆雄 「タンパク質の変性と生体防御」第十四回日本臨床プロテオゲノミクス研究会 平成30年5月（東京）

# タンパク質間相互作用学

助教 太期 健二

ペントラキシン3(PTX3)は液性パターン認識受容体の1つである。PTX3は"Antibody-like"な機構で病原体を排除する。特に *A. fumigatus* の conidia の除去機構(直接結合し、オプソニン化によって排除)はこれまでによく解析されている。PTX3 ノックアウトマウスは *A. fumigatus* 感染に致死的になり、さらに侵襲性肺アスペルギローシスモデルマウスへの PTX3 投与は感染抵抗性が向上するという報告から、PTX3 による *A. fumigatus* 感染防御反応の細胞レベルでの機能、薬理的な機能のより詳細な理解が創薬のリードとなる可能性がある。

最近我々は、 $H_2O_2$  存在下で次亜塩素酸 (HOCl) を生成することで殺菌活性を発揮する酵素であるミエロペルオキシダーゼ (MPO) と PTX3 の相互作用に注目し、*in vitro* 解析の結果 PTX3 が MPO の酵素活性を高める機能を持ち、結果 MPO による conidia 殺菌効率を上げることを示した。この知見から、PTX3 が "Antibody-like" な機能の範疇を超えた新しい自然免疫反応機構を持つということを示している。PTX3 と MPO は好中球細胞外トラップ (NETs) に共局在することが知られており、NETs において PTX3 は MPO の conidia 殺菌効率を上げている可能性が考えられた。今後は「PTX3 による MPO 殺菌促進機構が NETs という生体由来の構造物でも起こりうるか? またその詳細な機構はどうなっているのか?」を詳細に解析したい。

PTX3 が属するペントラキシンファミリーには、急性期反応タンパクとしてよく知られている C 反応性タンパク質 (CRP) や血清アミロイド P タンパク (SAP) など含まれていることから、PTX3 は様々な疾患における血中濃度の臨床的意義の研究が行われている。敗血症において血中 PTX3 濃度は生理的濃度の 100 倍以上に達し、予後予測マーカーとしての可能性が期待されている。しかしながら、好中球の活性化状態が敗血症の予後を反映するマーカーであると考えられているにもかかわらず PTX3 の発現部位は好中球以外にもあるため、部位特異的、特に好中球特異的な PTX3 の測定方法が望まれている。

そういった状況の中、我々はプロテオミクス手法を用いて敗血症患者血中 PTX3 が MPO との複合体を形成していることを見出した。これまで PTX3 複合体の濃度を測定された例はなく、PTX3-MPO 複合体は好中球由来 PTX3 と同義であるとみなされる。そこで「PTX3-MPO 複合体を測定することで感度の高い敗血症予後診断方法を開発する」ことを目指している。

PTX3 は自然免疫反応の他、炎症反応の調整、マトリックス形成、血管新生、妊娠においても機能を発揮する。この多機能性は PTX3 が様々なリガンドとの結合性を有し、特定のリガンド結合が PTX3 の特定の機能を発揮するトリガーであると考えられている。本研究により PTX3 複合体濃度測定 of 臨床的意義が示されれば、血中 PTX3 複合体測定がその PTX3 の機能に関連する疾患についての状態を知る手がかりであることになり、他のリガンドと PTX3 複合体測定による診断へと発展できる可能性が期待できる。

# タンパク質間相互作用学

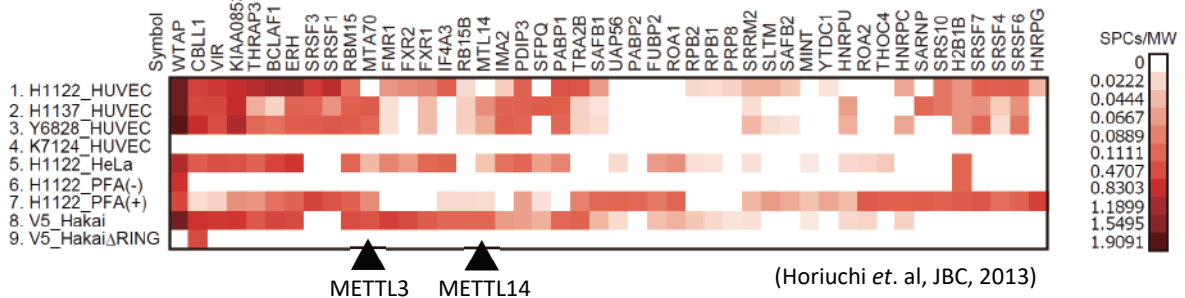
助教 堀内 恵子

「オルタナティブスプライシングによる遺伝子発現調節」

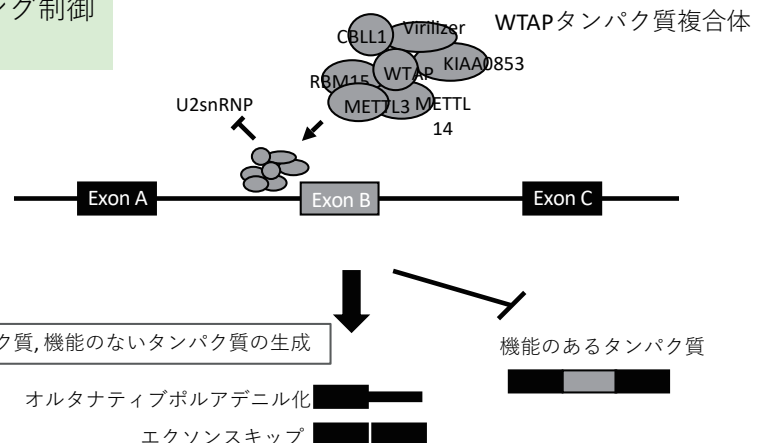
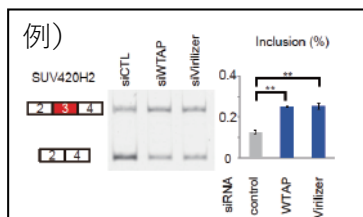
オルタナティブスプライシングは1つの遺伝子から複数の mRNA isoform を生じることでタンパク質の多様性をもたらす。哺乳類の細胞では 90% 以上の遺伝子でオルタナティブスプライシングが起こると推定されている。Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) は、マウス初期発生および細胞周期の G2/M 移行に必須のスプライシング因子であるが、そのターゲット RNA はあまり明らかになっていない。我々はこれまで、WTAP の特異的抗体を用いた免疫分離プロテオミクスにより、WTAP に結合するタンパク質として、VIRILIZER, CBLL1, KIAA0853, RBM15, BCLAF1, THRAP3 および複数のスプライシング因子を同定してきた。WTAP 複合体によるオルタナティブスプライシングのターゲット RNA を同定する目的で、WTAP をノックダウンした細胞（ヒト臍帯静脈内皮細胞、HUVEC）を用いた RNAseq を行い、スプライシングの変化を解析した。その結果、WTAP がヒストン H4K20 のメチル化酵素である SUV420H2 および SUV420H1 のオルタナティブスプライシングを制御し、H4K20 のメチル化レベルの調節に関与していることがわかった。

## WTAP複合体のプロテオミクス解析

3種類の異なる抗WTAP抗体(lane1-3)を用いて免疫分離プロテオミクスを行い、N6アデノシンメチル化酵素METTL3, METTL14を結合因子として同定した



## WTAP複合体によるスプライシング制御 (モデル)



# タンパク質間相互作用学

助教 早田 敬太

Neutrophil Extracellular Traps (NETs) 由来の細胞外ヒストンが抗菌作用を持つこと (Brinkmann V et al. *Science*, 303, 1532 (2004))、また細胞外ヒストンが血管内皮細胞を傷害し、そのことが敗血症の原因の一つであることが近年明らかになってきた (Xu J et al. *Nature Medicine*, 15, 11,1318 (2009))。我々はこれらの細胞外ヒストンが血管内皮細胞に傷害を与えるメカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めている。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞である HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) を用いてヒストン投与の実験を進めている中で、我々は HUVEC が傷害を受け、さらに細胞外領域へベジクルを放出していることを見出した。このような細胞外ベジクルの解析を通し、あらたな血管内皮細胞傷害のマーカーとなりうるタンパクの同定を目指している。近年、このような細胞外ベジクルの解析が進んでいる。サイズによって、大まかにエクソソーム、マイクロベジクル、アポトーティックボディと3種類に分類されている。これらはその形成されるメカニズムが異なることが報告されており、遠心分離によって分類され、また、それぞれに含まれるタンパク質も報告されている。我々も報告されている遠心分離に従い、ヒストン投与後4時間後の細胞上清を回収し、10000g, 100000g で得られたペレットをプロテオミクスで解析した。その結果、エクソソーム、マイクロベジクルの構成成分としてすでに報告されたタンパク質が同定された一方で、血管内皮細胞特異的に発現している膜タンパク質を同定することができた。また、ベジクルにはヒストンが同定されていた。

細胞外ヒストンが敗血症の原因の一つであることが明らかにされている一方で、好中球の破裂に従うこのような局所のヒストンを指標にした診断は定量が困難である。そのため、このようなベジクル上のヒストンを解析することができれば、局所の血管内皮細胞の傷害の有効な診断方法になることが期待される。そこで、プロテオミクスにより同定した血管内皮細胞特異的に発現しているタンパク質に対する抗体、さらにヒストンに対する抗体を我々は作成し、細胞外ベジクルのそれらのタンパク質を検出できるかを検証した。その結果、ヒストン投与後の血管内皮細胞の培養上清に対し、フローサイトメトリーで蛍光強度のピークのシフトを確認した。

また、ヒストン投与後のヒストンの局在、または、同定した膜タンパク質の局在を免疫電顕で観察した結果、ベジクル上にそれらのタンパク質が局在していることを確認している。細胞外ベジクル上のヒストンや膜タンパク質に着目した解析法により、ヒトにおける血管内皮細胞傷害の診断ができるような開発を現在試みている。



# 武蔵小杉地区動物実験室

運営委員会委員長 南 史朗

## 【運営概要】

武蔵小杉地区動物実験室は、日本医科大学の共同利用研究設備として先端医学研究所と武蔵小杉病院が中心となって管理運営を行っている。

1. 動物実験委員会の開催

日時：平成 29 年 4 月 19 日 午後 1 時 00 分 場所：第一会議室 出席者数：14 名

2. 動物実験新規利用者向け講習会（教育訓練）の開催

日時：平成 29 年 5 月 15 日 午前 10 時 00 分 場所：南所長室 出席者数：6 名

3. 動物実験計画書の申請課題数 38 件

4. 感染実験や発がん実験等の注意を要する実験の件数 3 件

5. 年間延べ入室者数 3,197 名

6. 日平均飼育数 マウス 849 匹、ラット 242 匹

7. 年間使用動物数 マウス 3,302 匹、ラット 846 匹

8. SPF 微生物モニタリングの実施

平成 29 年 4 月 10 日、平成 29 年 10 月 23 日、平成 30 年 2 月 26 日

9. 定期清掃の実施

SPF 飼育室 平成 29 年 10 月 17-18 日、平成 30 年 2 月 1-2 日

10. 実験動物慰霊祭への参加

日時：平成 29 年 11 月 10 日午後 5 時 30 分 場所：医学部教育棟講堂 出席者数：17 名

# 平成30年度(2018年度) 先端医学研究所セミナーおよびリサーチ・コロキウム

## ■ 平成30年度 日本医科大学先端医学研究所公開セミナー

日時：2018年12月19日（水）13:00-18:05

場所：日本医科大学武蔵小杉病院 南館 2F 講堂

主催：日本医科大学先端医学研究所

事務局：先端医学研究所 細胞生物学部門

運営委員：藤原正和（病態解析学）・豊島由香（生体機能制御学）・  
早田敬太（タンパク質間相互作用学）・上村尚美（細胞生物学）・  
宮部斉重（細胞生物学）・阿部芳憲（遺伝子制御学）

## プログラム

- 13:00-13:05 開会の挨拶 先端医学研究所 所長 南 史朗
- 先端研・病院所属の研究者による口頭発表（1）  
座長：藤原 正和（病態解析学部門）  
豊島 由香（生体機能制御学部門）
- 13:05-13:30 Complement C5a Receptor is the Key Initiator of Neutrophil Adhesion Igniting Immune Complex-Induced Arthritis  
宮部 斉重（細胞生物学部門）
- 13:30-13:55 KRAS 変異を持つ癌における PRMT5 - GLI1 経路による癌幹細胞維持機構の解析と治療への応用  
阿部 芳憲（遺伝子制御学部門）
- 13:55-14:20 オルタナティブスプライシングによる遺伝子発現調節  
堀内 恵子（タンパク質間相互作用学部門）
- 14:20-14:30 休憩
- 14:30-15:30 先端研・病院所属の研究者によるポスター発表
- P1：Social isolation facilitates parental behavior in both sexually naive female and male ddN mice  
折笠 千登世（生体機能制御学部門）
- P2：Insulin Receptor Substrate-2 Knockout Rats Generated by CRISPR/Cas9-mediated Genome Editing Exhibit Growth Retardation.  
豊島 由香（生体機能制御学部門）
- P3：Effects of conditional knockout of MCH neurons on mating behavior in mice  
加藤 陽子（生体機能制御学部門）
- P4：微小管阻害薬パクリタキセルに対する細胞死誘導機構の解析  
中嶋 亘（遺伝子制御学部門）

- P5 : cGAS-STING-IFN経路を介したがん細胞の維持機構の解明  
上原 郁野 (遺伝子制御学部門)
- P6 : MyD88シグナルはNF- $\kappa$ B / HIF-1 $\alpha$ を介して癌化を誘導する  
谷村 篤 (遺伝子制御学部門)
- P7 : IL-8によるO-GlcNAc化の増大はがん幹細胞の機能を維持する  
清水 幹容 (遺伝子制御学部門)
- P8 : 転写因子HIF-1 $\alpha$ による薬剤耐性獲得と癌幹細胞維持機構の解析  
岩渕 千里 (遺伝子制御学部門)
- P9 : 非小細胞肺癌におけるアポトーシス調整因子を標的とした新規治療法の開発  
中道 真仁 (遺伝子制御学部門)
- P10 : 酸化ストレスモニターマウスを用いた免疫細胞の解析  
上村 尚美 (細胞生物学部門)
- P11 : 血管新生は内腔圧により機械的伸展刺激を介して制御される  
弓削 進弥 (病態解析学部門)
- P12 : Rap1b regulates hematopoietic stem cell development by promoting integrin  $\beta$ 1-mediated cell adhesion  
Rho, Seung-Sik (病態解析学部門)
- P13 : 血管新生における内皮細胞の集団運動を制御する分子機構の解明  
一細胞間接着部位に生じる機械的力の影響について—  
藤原 正和 (病態解析学部門)
- P14 : Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish  
野一色 千景 (病態解析学部門)
- P15 : ペントラキシン3 (PTX3)とミエロペルオキシダーゼ(MPO)による協調的な  
殺菌メカニズムの解明  
太期 健二 (タンパク質間相互作用学部門)
- P16 : ヒストンの血管内皮細胞障害を阻害するPTX3の凝集パターン解析  
早田 敬太 (タンパク質間相互作用学部門)

- 15:30-15:35 休憩  
先端研・病院所属の研究者による口頭発表 (2)  
座長: 宮部 斉重 (細胞生物学部門)  
阿部 芳憲 (遺伝子制御学部門)
- 15:35-16:00 ゼブラフィッシュの蛍光イメージングによる糸球体毛細血管の形成  
メカニズムの解明  
西村 祐介 (病態解析学部門)
- 16:00-16:25 ラット肝臓において成長ホルモンによって減少するタンパクの解析  
中田 朋子 (生体機能制御学部門)
- 16:25-16:50 乳癌手術検体における非典型的細胞分裂とその臨床的意義  
大橋 隆治 (病理診断科)

16:50-17:00 休憩

特別講演

17:00-18:00 腸管 IgA 抗体による腸内細菌叢制御

新藏 礼子 (東京大学定量生命科学研究所 免疫・感染制御研究分野)

座長: 岩井 佳子 (細胞生物学部門)

18:00-18:05 閉会の挨拶 遺伝子制御学部門 田中 信之

# 平成30年度 日本医科大学 先端医学研究所公開セミナー

日時： 2018年12月19日（水） 13:00-18:05

場所： 日本医科大学武蔵小杉病院 南館2F 講堂  
（東急東横線・JR南武線 武蔵小杉駅 歩4分、東急東横線 新丸子駅 歩6分）

## プログラム：

### 特別講演

新藏 礼子 先生  
東京大学定量生命科学研究所 免疫・感染制御研究分野  
「腸管IgA抗体による腸内細菌叢制御」

### 先端研・病院所属の研究者による一般口演

宮部 斉重 先生（細胞生物学部門）  
「Complement C5a Receptor is the Key Initiator of Neutrophil Adhesion  
Igniting Immune Complex-induced Arthritis」

阿部 芳憲 先生（遺伝子制御学部門）  
「KRAS変異を持つ癌におけるPRMT5-GLI1経路による癌幹細胞維持機構の  
解析と治療への応用」

堀内 恵子 先生（タンパク質間相互作用学部門）  
「オルタナティブスプライシングによる遺伝子発現調節」

西村 祐介 先生（病態解析学部門）  
「ゼブラフィッシュの蛍光イメージングによる糸球体毛細血管の形成メカニズムの解明」

中田 朋子 先生（生体機能制御学部門）  
「ラット肝臓において成長ホルモンによって減少するタンパクの解析」

大橋 隆治 先生（武蔵小杉/病理診断科）  
「乳癌手術検体における非典型的細胞分裂とその臨床的意義」

先端研所属の研究者によるポスター発表 16演題

★事前登録は不要です。どなたでもご参加いただけます。

### 運営事務局 & 問合せ：

日本医科大学 先端医学研究所 細胞生物学部門  
所在地： 〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町1-396  
連絡先電話： 044-733-1821（内線8873）  
連絡先Eメール： y-iwai@nms.ac.jp



# 平成30年度 日本医科大学 先端医学研究所 公開セミナー 抄録

先端研・病院所属の研究者による口頭発表 (1)13:05-14:20

## 1. Complement C5a Receptor is the Key Initiator of Neutrophil Adhesion Igniting Immune

### Complex-induced Arthritis

宮部 斉重 (細胞生物学部門)

免疫複合体 (IC) により引き起こされる炎症反応は III 型アレルギーと呼ばれ、Tissue Resident Cells が IC を感知し免疫細胞を異常遊走させる。関節リウマチは III 型アレルギーに分類されるが、正常な関節内腔は関節液で満たされ、血流も遮断され、Tissue Resident Cells は存在せず、どのように炎症が惹起されるかは不明であった。我々は関節内インビボイメージングシステムを用いて、関節内に沈着した IC が補体経路を活性化させ、補体 C5a が血管内皮へ沈着し直接免疫細胞を異常遊走させることを見出した。さらに補体受容体 C5aR が異常遊走の起点となる免疫細胞の血管内皮への接着を促進し、脂質メデイエーター受容体 BLT1 が炎症惹起となる免疫細胞の組織浸潤に必要であり、ケモカイン受容体は後期の炎症増悪に関与することを解明した。

## 2. KRAS 変異を持つ癌における PRMT5-GLI1 経路による癌幹細胞維持機構の解析と治療への応用

阿部 芳憲 (遺伝子制御学部門)

KRAS 遺伝子への変異は膵臓癌や肺癌などで高頻度に見られる。KRAS 遺伝子変異を持つこれらの癌に対して有効な治療法はなく、5年生存率も極めて低い。我々はこれまで EGFR 遺伝子に変異を持つ肺腺癌で、アルギニンメチル基転移酵素 PRMT5 が GLI1 をメチル化して活性化へ導く経路が、癌幹細胞の維持に重要な役割を果たすことを見出した。さらに PRMT5 を介した GLI1 活性化経路は、KRAS 遺伝子に変異を持つ癌 (肺癌、膵臓癌、大腸癌) でも癌幹細胞に維持に関与していることが分かった。今年先端研公開セミナーでは、この経路を介した癌幹細胞維持機構と、癌治療への応用の可能性について紹介する。

## 3. オルタナティブスプライシングによる遺伝子発現調節

堀内 恵子 (タンパク質間相互作用学部門)

オルタナティブスプライシングは1つの遺伝子から複数の mRNA isoform を生じることでタンパク質の多様性をもたらす。哺乳類の細胞では90%以上の遺伝子でオルタナティブスプライシングが起こると推定されている。Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) は、マウス初期発生および細胞周期の G2/M 移行に必須のスプライシング因子であるが、そのターゲット RNA はあまり明らかになっていない。我々はこれまで、WTAP の特異的抗体を用いた免疫分離プロテオミクスにより、WTAP に結合するタンパク質として、VIRILIZER, CBLL1, KIAA0853, RBM15, BCLAF1, THRAP3 および複数のスプライシング因子を同定してきた。WTAP 複合体によるオルタナティブスプライシングのターゲット RNA を同定する目的で、WTAP をノックダウンした細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞、

HUVEC) を用いた RNAseq を行い、スプライシングの変化を解析した。その結果、WTAP がヒストン H4K20 のメチル化酵素である SUV420H2 および SUV420H1 のオルタナティブスプライシングを制御し、H4K20 のメチル化レベルの調節に関与していることがわかった。

## 先端研・病院所属の研究者による口頭発表 (2) 15:35-16:50

### 4. ゼブラフィッシュの蛍光イメージングによる糸球体毛細血管の形成メカニズムの解明

西村 祐介 (病態解析学部門)

腎臓は、血液中の老廃物の除去や体内の体液量・イオンバランスを制御する重要な臓器であり、血管はこれら機能制御において中心的な役割を担っている。本研究では、ゼブラフィッシュを用いた蛍光イメージングにより、血液濾過機能を担う糸球体において、機能的な毛細血管網が構築されるメカニズムの解明を目指した。背側大動脈から出芽した血管が、血管新生により前腎原基に侵入し、その後、活発にリモデリングすることで、糸球体内に球状に集まった特殊な毛細血管網が構築されることを見出した。また、前腎原基への血管侵入及びリモデリングには血流が必須であり、従来とは異なるタイプの血管新生が糸球体血管網の構築に関与している可能性が示された。

### 5. ラット肝臓において成長ホルモンによって減少するタンパクの解析

中田 朋子 (生体機能制御学部門)

ラット肝臓において成長ホルモン (GH) は cytochrome P450 (CYP) 2B1 タンパクの量を減少させる。一方、CYP2B1 の発現は核内受容体 constitutive androstane receptor (CAR) によって誘導される。CAR は異物によって活性化され、retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成し、異物代謝に関与する遺伝子の発現を調節する。

また、FoxO1 等とクロストークすることにより、糖新生を調節する。脳下垂体を摘除した (HPX) ラットおよび正常ラットの肝臓を用いて、CAR mRNA とタンパクに対する GH の影響を調べたので報告する。

### 6. 乳癌手術検体における非典型的細胞分裂とその臨床的意義

大橋 隆治 (病理診断科)

非典型的細胞分裂 (atypical mitosis, AM) は、悪性腫瘍の遺伝子異常によって発現するが、乳癌の AM とその臨床的意義に関する研究報告はない。我々は、乳癌手術検体 109 例を用いて、AM の発現を組織学的に評価し、臨床病理像との関係を検討した。AM は、形態学的に、multipolar, lagged, ring, asymmetrical mitosis, anaphase-bridge の 5 種に分類できた。AM は、乳癌細胞にのみ観察され、非癌細胞には認められなかった。他の予後予測マーカーと比べ、AM のみが生存率の短縮と独立した関係を呈した。乳癌組織標本における AM は、有用な予後予測マーカーとなりうることが示唆された。

## 特別講演 17:00-18:00

東京大学定量生命科学研究所 免疫・感染制御研究分野 教授

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 客員教授

新藏 礼子 (しんくら れいこ)

### 腸管 IgA 抗体による腸内細菌叢制御

近年、腸内細菌叢の異常が多くの疾患の発症に関連すると報告されており、腸内細菌叢を改善することは健康維持に重要である。宿主側は腸管に分泌される IgA 抗体によって腸内細菌を認識し制御していることがわかってきたが、各 IgA 抗体が常在腸内細菌の何を認識しているのか、詳細は明らかではない。私たちはマウス小腸由来 IgA 産生細胞からモノクローナル IgA 抗体をクローニングし、各 IgA クローンが認識する細菌由来分子を探索している。IgA 抗体と腸内細菌との相互作用はまだ未知の部分が多く、今後のさらなる基礎研究が必要であるが、IgA 抗体を腸内細菌叢改善薬として利用する可能性について議論する。

■ 平成 30 年度 先端研リサーチ・コロキウム (Research Colloquium of I-AMS)

第 1 回 先端研リサーチ・コロキウム

日時：2018 年 5 月 23 日 (水) 16:00-17:00

場所：日本医科大学武蔵小杉病院 南館 2F 講堂

演者：濱窪 隆雄 (タンパク質間相互作用学部門)

「タンパク質相互作用と生体反応」

第 2 回 先端研リサーチ・コロキウム

日時：2018 年 9 月 19 日 (水) 17:00-18:30

場所：日本医科大学武蔵小杉病院 南館 2F 講堂

演者：Seung-sik, Rho (病態解析学部門)

「The Small GTPase Rap1 regulates hematopoietic stem cell development by enhancing integrin-mediated cell adhesion.」

第 3 回 先端研リサーチ・コロキウム

日時：2019 年 3 月 6 日 (水) 17:00-18:00

場所：日本医科大学武蔵小杉病院 南館 2F 講堂

演者：加藤 陽子 (生体機能制御学部門)

「Optogenetic analysis of the LHA function in parental behavior of mice.」

■ 平成 30 年度 研究所特別セミナー

日時：2018 年 6 月 14 日 (木) 17:00-18:30

場所：日本医科大学武蔵小杉病院 南館 2F 講堂

演者：岩井 佳子 (細胞生物学部門)

「免疫抑制の分子機構」

# 平成30年度(2018年度)競争的研究資金獲得状況

## 【病態解析学部門】

(1) 日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的先端研究開発支援事業ソロタイプ (AMED-PRIME)  
「細胞接着装置におけるメカノトランスダクションが血管新生・造血発生を制御するメカニズム」

研究代表者 福原 茂朋

(2) 科学研究費補助金 基盤研究 (B)

「生体イメージングによる血管新生の多様性と普遍性の解明」

研究代表者 福原 茂朋

(3) 科学研究費補助金 挑戦的研究 (萌芽)

「血管新生における血管内腔圧の新たな機能の解明」

研究代表者 福原 茂朋

(4) 科学研究費補助金 若手研究 (B)

「ゼブラフィッシュ成魚で確立したライブイメージング法による創傷時血管新生機構の解明」

研究代表者 弓削 進弥

(5) 平成30年度 (第32回) ノバルティス研究奨励金

「血管内腔圧による血管新生の新たな制御機構の解明」

研究代表者 福原 茂朋

(6) 平成30年度愛媛大学プロテインサイエンスセンター共同研究

「ゼブラフィッシュを用いた新規血管新生制御タンパク質 KCTD10 の *in vivo* イメージング解析」

研究代表者 福原 茂朋

(7) 平成30年度神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究

「血管新生過程の内皮細胞運動における細胞膜張力の役割の解明」

研究代表者 福原 茂朋

## 【細胞生物学部門】

(1) 日本私立学校振興・共済事業団学術研究振興資金

「非コード RNA を分子基盤とした包括的がん治療戦略の開発」 (代表: 鈴木秀典)

岩井 佳子

(2) 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (C)

「水素分子の炎症制御機構解析-慢性炎症を基盤とした生活習慣病対策に向けて-」

上村 尚美

(3) 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (C)

「脂質ラジカル連鎖反応への水素分子の関与:水素の抗炎症メカニズムの解明に向けて」

西槇 貴代美

(4) 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (C)

「水素分子の脳・心機能障害後の予後改善効果と作用機序の解明」

横田 隆



- (5) Rheumatology Research Foundation, Innovative Research Grant  
 「In vivo Imaging of the Arthritic Joint Reveals New Mechanisms for Old Mediators」  
 (代表: Andrew D. Luster)

宮部 斉重

**【遺伝子制御学部門】**

- (1) 私立大学等経常費補助金特別補助「戦略的研究基盤支援」  
 「Clinical Rebiopsy Bank Project を基盤とした包括的がん治療開発拠点形」  
 (代表: 弦間昭彦) 田中 信之
- (2) 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (B)  
 「肺がんの成因及び再発に関わるがん幹細胞の発生とがん微小環境での維持機構の解析」  
 田中 信之
- (3) 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (C)  
 「乳癌のサブタイプ別に化学療法の治療効果を決定づける因子の解析と治療予測効果の検討」  
 中嶋 亘
- (4) 日本学術振興会科学研究費補助金 若手研究 (B)  
 「低酸素応答因子 HIF-1 $\alpha$  による薬剤耐性獲得機構と癌幹細胞維持機構の解析」  
 岩渕 (吉田) 千里
- (5) 日本学術振興会特別研究員奨励費  
 岩渕 (吉田) 千里
- (6) 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (C)  
 「cGAS-STING 経路によるがん細胞の維持機構と転移促進機構の解析」2019-2021 年度  
 上原 郁野
- (7) 文部科学省 科学研究費補助金 若手研究  
 「炎症性ケモカイン IL-8 依存的に制御される癌幹細胞の同定と制御機構の解析」2019-2021 年度  
 清水 幹容
- (8) 日本医科大学 丸山記念研究助成金  
 「癌細胞の不均一性がもたらす IL-8 依存的な癌幹細胞の制御機構の解析」2019 年度  
 清水 幹容
- (9) 日本医科大学 若手研究者奨励助成金  
 「大腸癌幹細胞を標的とした GlcNAc 合成経路阻害剤の抗腫瘍効果の解析」2018 年  
 清水 幹容

**【生体機能制御学部門】**

- (1) 科学研究費補助金・基盤 C  
 鈴木 (豊島) 由香

**【遺伝子制御学部門】**

- (1) 基盤研究 (C)  
 「液性パターン認識受容体 PTX3 による真菌殺菌促進機構の解析」  
 太期 健二
- (2) 基盤研究 (C)  
 「細胞外ベジクル上ヒストンに着目した敗血症早期診断法の開発」  
 早田 敬太

# 先端医学研究所・教職員，研究者等氏名

平成 31 年 3 月 31 日現在

## I. 病態解析学部門

部門責任者・大学院教授

福原 茂朋

助教

藤原 正和

助教

弓削 進弥

助教

Rho Seung-Sik

ポスト・ドクター

西村 祐介

博士研究員

友利 裕二（整形外科）

大学院生

野一色千景（形成外科）

大学院生

新井 桃子（腎臓内科）

アシスタント・スタッフ

一宮 治美

アシスタントサポート・スタッフ

小栗 エリ

秘書兼技術スタッフ

加藤久充子

## II. 細胞生物学部門

部門責任者・大学院教授

岩井 佳子

准教授

上村 尚美

講師

Wolf Alexander Martin

（平成 30 年 4 月～ 9 月）

講師

宮部 斉重（平成 30 年 10 月～）

マネジメントサポート・スタッフ

横田 隆

マネジメントサポート・スタッフ

西槇貴代美

## III. 遺伝子制御学部門

部門責任者・大学院教授

田中 信之

講師

中嶋 亘

助教

阿部 芳憲

助教

上原 郁野

助教

谷村 篤子

ポスト・ドクター

清水 幹容

ポスト・ドクター

岩渕（吉田）千里

テクニカル・スタッフ

浅野 由ミ

テクニカル・スタッフ

梶田 満子

研究生

土佐真美子（形成外科）

研究生

中道 真仁（呼吸器内科）

研究生

阪口 正洋（血液内科）

研究生

大森 郁子（血液内科）

実験補助

枝川 聖子

## IV. 生体機能制御学部門

部門責任者・大学院教授

南 史朗

准教授

折笠千登世

講師	豊島 由香
助教	中田 朋子
マネジメントサポート・スタッフ	勝又 晴美
テクニカル・スタッフ	時田 玲子
ポスト・ドクター	加藤 陽子
大学院生	矢野 宏行
特別研究生	鈴木 信周
研究生	八木 孝
研究生	鈴木るり子
研究生	大槻 昌子
研究生	藤井加代子
研究補助員	大木佳菜子
講師（内分泌糖尿病代謝内科学分野）	石川真由美

#### V. タンパク質間相互作用学部門（社会連携講座）

社会連携講座教授	浜窪 隆雄
社会連携講座助教	太期 健二
社会連携講座助教	堀内 恵子
社会連携講座助教	早田 敬太
特別研究生	高松祐一郎

#### VI. 分子生物学部門

部門責任者代行	南 史朗
---------	------

#### VII. ゲノム医学部門

部門責任者代行	南 史朗
---------	------

#### VIII. アイソトープ実験室

室 長	田中 信之（～平成 30 年 10 月）
放射線取扱主任者	上原 郁野（～平成 30 年 10 月）

#### IX. 組換え DNA 実験施設

安全主任者	中田 朋子
-------	-------

#### X. 動物実験室

実験動物飼育員	金井祐美子
---------	-------

#### X. 事務室

事務室長	金子 勲
主任	細谷 宏美（平成 30 年 7 月～）
事務員（嘱託）	里見 裕右（～平成 30 年 6 月）
パート事務員	鈴木 弓子
パート事務員	山田 深雪

## 先端医学研究所紀要 第4巻

---

令和元年9月30日印刷

令和元年10月1日発行（非売品）

発行 日本医科大学

先端医学研究所 紀要委員会

〒211-8533 神奈川県川崎市中原区小杉町1-396

TEL (044) 733-1821

FAX (044) 733-1877

---

印刷所 栄和印刷株式会社