

[0027]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2012

<https://doi.org/10.15017/26861>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 27, 2013. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :

ゲノム機能制御学部門
Department of Molecular Genetics

ゲノム病態学分野

Division of Molecular and Clinical Genetics

当分野では、血液・腫瘍性疾患に対する新規治療法開発を目的に、基礎ならび臨床研究を行っている。具体的には、A. 悪性腫瘍に対する遺伝子・免疫細胞治療の基礎および臨床研究、B. 再生医療等開発研究、を行ってきた。これらの基礎ならびに臨床研究を積極的に進めることで、特に腫瘍性疾患に対するより効果的かつ安全な治療法を開発できるものと考えている。なお、われわれの研究内容を含めた九州大学で開発された新規医療技術を、腫瘍性疾患を含む難病で苦しんでいる患者さんへ円滑かつ早期に還元していくためには、九州大学病院内での新システムの構築が極めて重要である。平成20年12月に九州大学病院が全国TR（トランスレーショナルリサーチ）拠点の1つに認定されて以来、当研究分野の臨床部門である先端分子・細胞治療科は九州大学病院高度先進医療センターならびに各診療部門の多大な協力を得ながら、九州大学病院内でのTR機構構築に邁進するとともに、悪性腫瘍に対する新規治療法の開発研究を実施している。

A. 悪性腫瘍に対する遺伝子・免疫細胞治療の基礎および臨床研究

近年の集学的治療法の進歩により、悪性腫瘍の治療成績は年々向上している。しかし、手術療法、化学療法、放射線療法等既存の一般的治療法に対する治療抵抗例や再発例などに対しては有効な治療法は無く、症状緩和療法主体の対症療法に留まっているのが現状である。したがって、これら現在の治療法では治癒が望めない症例に対して、新しい治療法を開発することが社会的にも強く要請されている。われわれは悪性腫瘍に対する第4の治療法としての免疫療法の可能性を、いくつかの方法を用いて検討している。

a. 進行・再発固形腫瘍（消化器がん・肺がん・子宮頸がん）に対するシクロホスファミド併用新規腫瘍関連抗原由来エピトープペプチドカクテルを用いた腫瘍特異的強化ワクチン療法第I相臨床試験(Murahashi, M., Tani, K. *et al.*)

本臨床試験では他に有効な標準治療法のない消化器癌、肺癌患者で HLA-A*2402 を有する患者を対象とし、CY 投与後、HLA-A*2402 拘束性で腫瘍抗原由来エピトープペプチド DEPDC1, KOC1, MPHOSPH1, TTK, CO16 (URLC10) 5 種を 1 回/週、計 4 回の皮下接種を 1 コースとして施行する。さらに適応基準を満たす患者には IL-2 の投与を行い、本治療法の安全性を検証する第 I 相臨床試験である。6 患者コホートの シクロホスファミド用量漸増試験とし、副次目的として、投与された患者の細胞性免疫および液性免疫反応誘導の可否および臨床効果についても検討する。これまでに適応患者 18 例への投与が完了し、現段階ではその安全性に問題は認められず、抗腫瘍免疫誘導の所見を認めた。現在、以上の結果を投稿中であるとともに、第 II 相医師主導治験実施に向けて

の準備中である。

b. RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならび RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第 I 相臨床試験 (Hijikata, Y., Tani, K. *et al.*)

他に有効な治療法のない進行固形腫瘍患者を対象に、23040 個の遺伝子情報から DNA マイクロアレイ法により tumor-associate antigen(TAA)として同定された新規腫瘍抗原 Ring finger protein 43(RNF43)を用いた強化養子免疫療法第 I 相臨床試験を開始した。本試験は他に有効な治療法のない進行固形腫瘍患者で、HLA-A*2402 または HLA-A*0201 を有し、かつ腫瘍に RNF43 が高発現している患者を対象とする。対象患者からアフレーシスにより末梢血単核球を分離し末梢血単核球由来樹状細胞(DC)を作成する。RNF43 ペプチドをパルスした DC と患者末梢血リンパ球と共培養することにより RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を誘導する。免疫寛容関連因子の排除を目的とした少量シクロホスファミド投与後、この活性化リンパ球および RNF43 ペプチドパルス DC の併用投与を行なう腫瘍特異的強化養子免疫療法の安全性および抗腫瘍免疫誘導効果を検討する第 I 相臨床試験である。RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球数の 2 群(各群 5 例、合計 10 例)に分けた容量漸増試験として計画した。Good Manufacturing Practice(GMP)に準拠した Cell Processing Center 施設で厳重な品質管理の下、細胞調製を行い、レベル 1 を完遂し、現在レベル 2 を遂行中である。本療法による有害事象(安全性評価)および免疫反応誘導、対象患者の生存期間、抗腫瘍効果(臨床効果など)について解析を進めている。

c. GM-CSF 遺伝子導入肺癌細胞移植後腫瘍形成拒絶過程における所属リンパ節樹状細胞の網羅的遺伝子発現解析 (Narusawa, M., Inoue, H., *et al.*)

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)は、種々の固形癌を対象とした腫瘍免疫療法の臨床研究において、抗腫瘍免疫効果を誘導する有効な刺激性サイトカインとして用いられてきた。GM-CSF が樹状細胞(DC)による T 細胞プライミングを促進することで抗腫瘍免疫効果を示すことは先行研究から示唆されるが、その分子学的メカニズムは不明な点が多い。

本研究では T 細胞プライミング時における GM-CSF 感作 DC の重要因子の同定を目的とし、以下の実験を施行した。GM-CSF 遺伝子搭載非伝播型センドライウイルスベクター(SeV/GM)により GM-CSF を遺伝子導入したマウス肺癌 LLC 細胞(LLC/SeV/GM)を C57/BL6 マウスの右側腹部に皮下接種し腫瘍形成を観察した際、LLC/SeV/GM 接種群(GM 群)では対照群と比較し有意に腫瘍形成が抑制された。また、GM-CSF 感作 DC は共刺激因子である CD86, CD80 分子の発現が高く、この DC の T 細胞プライミング能の経時変化を、リンパ球混合培養反応試験を用いて比較解析した結果、GM 群における感作 DC の T 細胞刺激能は腫瘍接種から 2 日後(day 2)で最大であった。以上の結果より、day 2 で GM-CSF 感作 DC による T 細胞プライミング能が最大となると考えられた。次に、T

細胞プライミングに関わる重要因子を同定するため、前述の所属リンパ節における GM-CSF 感作 DC を用いて DNA マイクロアレイによる網羅的比較解析を行った。この結果、GM 群において、対照群と比較し免疫応答関連分子（ケモカイン、転写因子等）、細胞間相互作用、細胞運動に関わる各遺伝子群の有意な発現変動を認めた。その中でも I 型 IFN 関連のシグナル伝達経路に関する遺伝子群が特に上昇しており、抗ウイルス免疫応答の際に中心的役割を担っている I 型 IFN 産生形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid DC : pDC）の同抗腫瘍免疫応答における役割に注目し、gain of function 或いは loss of function 実験を行い、これらの遺伝子の抗腫瘍効果への影響を検討した。同 LLC/SeV/GM 腫瘍細胞による腫瘍形成試験において、pDC を欠失したマウスにおいて上記抗腫瘍効果の減弱及び二次的 LLC 細胞再接種時における記憶免疫応答の減弱を認めた（loss of function）。さらに、pDC に特異的に発現する TLR7 を刺激し活性化する目的で、LLC/SeV/GM 細胞接種時に TLR7 リガンド Imiquimod を共投与（皮下接種）した結果、LLC/SeV/GM 細胞拒絶の増強を認めた。また、同 LLC/SeV/GM 細胞を放射線照射し腫瘍ワクチンを作成し（ir.LLC/SeV/GM）、LLC 同系担癌マウスモデルにおける ir.LLC/SeV/GM 及び Imiquimod 併用投与による治療的ワクチン効果を検証した結果、ir.LLC/SeV/GM 単独投与マウス群と比較し Imiquimod 併用マウス群において有意に高い抗腫瘍効果を認めた（gain of function）。同治療経過中、体重減少等の明らかな有害事象を認めなかった。免疫学的解析の結果、同併用マウス群の腫瘍所属リンパ節において抗腫瘍効果に重要と考えられている CD9 陽性 pDC 分画の増強を認め、抗腫瘍効果増強への関与が示唆された。以上の結果より、我々は GM-CSF 遺伝子導入自家腫瘍ワクチン治療において pDC が重要な役割を果たしており、pDC を活性化することにより同治療効果を増強することを明らかにした。

d. ロイコトリエン B4 受容体欠損マウス (BLT1-KO) における GM-CSF による長期的抗腫瘍効果誘導メカニズムの検討 (Yokota, Y., Inoue, H., *et al.*)

ロイコトリエン B4 (LTB4) は、cytosolic phospholipase A2 や 5-lipoxygenase (5-L0), LTA4 hydrolase などの一連の活性による細胞膜リン脂質由来の強力な炎症性脂質メディエーターで、主な作用としては白血球の活性化が知られている。LTB4 に対する高親和性受容体である BLT1 及び低親和性受容体である BLT2 は、炎症性疾患の病因や病原体侵入に対する宿主の白血球活性及び走化性に関与している。しかしながら、腫瘍免疫における LTB4 の役割はほとんど知られていない。我々はこれまで、GM-CSF 遺伝子導入 WEHI3B(W/GM)細胞を野生型 BALB/c マウスに皮下接種した腫瘍形成能試験において、約 2 週間以内に腫瘍の拒絶が確認されたことを報告した。今回、同様の腫瘍形成試験を野生型及び BLT1-KO マウスで行い、同様の腫瘍拒絶が再現された。腫瘍接種後 50 日目に、同数の WEHI3B 細胞を両マウス群に再接種すると、興味深いことに野生型マウスは腫瘍再拒絶されず死亡したのに対し、BLT1-KO マウスにおいて腫瘍再拒絶を認め有意に長く生存した。この再接種試験の原因機序解明を目的とし、50 日目以降に各主要免疫担当細胞（CD4+T 細胞, CD8+T 細胞, NK 細胞）の in vivo 欠失実験を施行したところ、CD4+T 細胞が BLT-KO マウスにおける長期的抗腫瘍効果に中心的役割を果

たしていることが明らかとなった。腫瘍接種後 46 日目における両マウス群 (WT/GM, BLT1-KO/GM) の所属リンパ節における各メモリーCD4+T 細胞 (CD44+或いは CD122+) の割合が BLT1-KO マウスにおいて高く、逆に免疫寛容 CD4+T 細胞 (GITR1+, PD-1+, CTLA4+) の細胞数が BLT1-KO マウスにおいて低かった。また、W/GM 細胞接種より 7 及び 10 日後の脾細胞再刺激における Th1 サイトカイン (IL-2 及び IFN- γ) の発現量は、野生型マウスと比較し BLT1-KO マウスにおいて高かった。さらに、BLT1-KO マウスにおいて、W/GM 細胞接種より 2 日後の所属リンパ節活性化樹状細胞の共刺激因子 CD40 及び CD80 及び CD86 の発現量の有意な発現上昇、あるいは接種 1 日後における腫瘍局所における抑制性サイトカイン (TGF- β , IL-10)、VEGF の有意な発現低下を野生型マウスと比較し認めた。また、GM-CSF による腫瘍感作メモリーCD4+T 細胞あるいは Th17 細胞の移植実験を施行した結果、両細胞分画が BLT1-KO マウスにおける長期的抗腫瘍効果に貢献していることを明らかにした。以上の結果より BLT1 受容体を介した LTB4 シグナル欠損は、各種自然免疫系細胞及び WEHI3B 腫瘍抗原に対する樹状細胞活性化を経由する腫瘍抗原特異的メモリーCD4+T 細胞 (細胞性免疫) を強力に誘導することにより長期的な腫瘍免疫を維持することが示唆された。現在まで、脂質メディエーターと腫瘍免疫を含む記憶免疫に関する知見はほとんどなく、今後さらなる分子学的レベルでの記憶免疫応答増強のメカニズムが明らかになれば、GM-CSF 誘導による長期的 (記憶) 腫瘍免疫応答誘導の増強への大きな一助となることが期待される。

e. 肺癌に対する新規腫瘍溶解性ウイルス Coxsackievirus B3 の同定とマウス *in vivo* 効果の検討 (Miyamoto, S., Inoue, H., *et al.*)

肺癌は本邦の癌死亡原因の第一位であり、既存の標準治療である手術療法、薬物療法及び放射線療法に対して不応な症例に対する新規治療法の開発が望まれている。近年、ウイルス自身の腫瘍溶解性を利用した腫瘍溶解性ウイルス療法が注目され、様々な臨床試験が施行されている。

今回、我々は新規腫瘍溶解性ウイルス療法の開発を目的に、宿主ゲノムへの変異誘導による癌化リスクのない RNA ウイルスであるピコルナウイルス科エンテロウイルス属に着目した。1 次スクリーニングとして 28 種の各野生型ウイルス株を各種ヒト癌細胞株に *in vitro* で感染させ、3 種類の Coxsackievirus B (CVB) 群が肺癌に対して顕著な腫瘍溶解活性を呈することを明らかにした。次に 2 次スクリーニングの結果、この中で特に CVB3 が 9 種類中 8 種類の非小細胞肺癌細胞株を非常に低い感染力価 (MOI = 0.001) で殺傷することを見出した。一方で 2 種の正常肺線維芽細胞に対する細胞溶解性は極めて低かった (MOI = 1)。以上の CVB3 による殺癌細胞効果は CVB3 受容体 (CAR、DAF) の発現量と相関性を認め、CAR を siRNA により欠失させた癌細胞においてその抗腫瘍効果が大幅に減少した。また、各種阻害実験結果より、同ウイルスの肺癌細胞における細胞傷害性において、アポトーシス機構が亢進しカスパーゼ群が部分的に寄与していること、PI3K/Akt 及び MEK/ERK シグナル伝達経路が関与することを明らかにした。次にヒト肺癌 A549 細胞を用いた皮下担癌ヌードマウスモデルにおいて、CVB3 の腫瘍内投与により原発巣及び対側の遠隔転移モデル病巣 (未治療側) に対しても有意な腫瘍退縮を認め、それぞれの治療系において生存率の有意な延長を認め、未治療腫

瘍内での CVB3 の存在を確認することで同ウイルスの systemic oncolytic effect が証明された。本治療後経過観察中において CVB3 投与による致死的な副作用は観察されなかった。また、CVB3 腫瘍内投与後の腫瘍浸潤免疫細胞アッセイにて、CVB3 投与により著明な自然免疫細胞 (NK 細胞, 顆粒球 マクロファージ, 活性化樹状細胞) の腫瘍内浸潤を認めた。NK 細胞、顆粒球を欠失させたマウスモデルにおいて、その抗腫瘍効果が減弱したことから自然免疫細胞の活性化が同抗腫瘍効果に synergistic な効果を誘導することが証明された。さらに、CVB3 が非小細胞肺癌細胞感染後の腫瘍崩壊時に免疫刺激性物質として知られる Calreticulin (CRT) の細胞膜外暴露、核内 HGMB1 タンパクの細胞質移行及び ATP の細胞外放出を促進することを明らかにした。

以上の in vitro 及び in vivo 実験結果より本研究において、CVB3 の非小細胞肺癌に対する特異的かつ免疫刺激性を有する腫瘍溶解性及、従来のコクサッキーウイルス (CVA21) と比較し高い安全性が証明された。現在、さらに安全性を高める目的で遺伝子改変を加えた新規腫瘍溶解性ウイルス療法の開発及び免疫学的抗腫瘍効果を増強する目的で、GM-CSF 遺伝子導入 CVB3 の改変の構築に成功しており、今後これらの新規遺伝子改変 CVB3 を用いた臨床応用を最終目的とし小動物モデルを用いた基礎研究の実施を検討中である。

f . 癌幹細胞を標的とした特異的免疫遺伝子治療法の開発に向けた基礎的研究 (Sakamoto C., Inoue, H., et al.)

癌幹細胞説では、腫瘍の形成と増殖は自己複製能と多分化能を持った少数の幹細胞様の癌細胞によるものと考えられている。それらの癌幹細胞はいくつかの表面マーカーの有無や Side Population (SP) と呼ばれる薬剤排出能を指標とした方法によって同定されている。現在の癌治療戦略において、抗癌剤抵抗性や高い腫瘍免疫寛容誘導能を有する癌幹細胞は重要な新規ターゲットとなる可能性が高い。また、近年、GM-CSF を中心としたサイトカインや腫瘍抗原遺伝子等を免疫担当細胞や腫瘍細胞に遺伝子導入後、ワクチンとして患者に投与することにより抗腫瘍効果を得ようとする ex vivo 免疫遺伝子治療が欧米を中心に試みられている。以上の背景より、我々は、癌幹細胞を標的とした特異的免疫療法の前臨床研究モデルを作成することを目指した。BALB/c マウス由来乳癌細胞株 4T1 から、癌幹細胞として SP 分画を分離し、SP 分画にセンダイウイルスベクター (SeV) を用いて顆粒球・マクロファージ刺激因子 (GM-CSF) 遺伝子を遺伝子導入した SP/GM 細胞を作製した。

本研究によって得られた SP 分画は non-SP 分画と比較し、in vitro においてより多くのコロニーを形成し、免疫寛容に関する抑制性共刺激因子 B7-H1 (PD-L1 : CD274) を高く発現し、さらに一定期間の培養することによって、より高度に他方の population を再構成することが示された。また、in vivo においても、高い腫瘍形成能を示した。これらの結果から、本研究で得られた SP が癌幹細胞様の性質を保持していることが確認された。また、センダイウイルスベクターを用いて GFP 或いは GM-CSF 遺伝子を SP へ遺伝子導入することができる事を確認した後、これらの細胞を野生型マウスの右側

腹部へ皮下接種した。その結果、non-SP/GM 細胞と同様、SP/GM 細胞接種マウスが対照群 (SP 接種群及び SP/GFP 接種群) と比較し、有意にそれらの腫瘍形成を抑制した。その抗腫瘍免疫効果の誘導メカニズムを明らかにする目的で各主要免疫担当細胞 (CD4+T 細胞, CD8+T 細胞, NK 細胞) の *in vivo* 欠失実験を施行したところ、CD8+T 細胞を中心とした免疫担当細胞が野生型マウスにおける長期的抗腫瘍効果に関与していることが明らかとなった。さらに、上記細胞を用いて作製した腫瘍ワクチン細胞による治療が、4T1-SP 担癌マウスモデルにおいて抗腫瘍効果を誘導することを明らかにした。これまで、癌幹細胞は腫瘍免疫を回避するための抑制機構が比較高いとされており、実際に我々の検討においても、4T1-SP 細胞において抑制性サイトカインのひとつである VEGF 及び細胞内 STAT3 活性の増強が認められた。以上の結果より、癌幹細胞を標的とした GM-CSF 遺伝子導入癌幹細胞を用いたワクチン治療法は、4T1-SP 細胞が免疫寛容の形質を有するにも関わらず、未知の癌抗原を含んだ癌幹細胞関連抗原に対しても十分な免疫応答を誘導し、高い抗腫瘍効果を得られる可能性が示唆された。以上の結果を背景に、さらなる基礎研究の推進は、今後の根治的新規腫瘍免疫療法の開発において意義深いと考えられる。

g. 癌幹細胞を標的とした GM-CSF 遺伝子導入自家 iPS 細胞ワクチンを用いた新規腫瘍免疫療法の開発 (Watanabe, A., Inoue, H. *et al.*)

近年、腫瘍発生あるいは再発の原因として考えられる少数の癌幹細胞に対する治療戦略が固形癌治療において極めて重要であると考えられている。胚性幹 (ES : embryonic stem) 細胞は、いわゆる癌幹細胞とも共通する幹細胞関連抗原を発現していることが知られており、癌幹細胞を標的とした新たな細胞ワクチン療法としての有効性が期待できる。しかし ES 細胞を本目的で用いた場合、その使用による倫理的課題が問題となり得る。近年、同課題を克服する目的で ES 細胞に極めて類似した遺伝子発現様式を有する人工多能性幹細胞 (iPS : induced pluripotent stem) が、体細胞に初期化因子遺伝子を導入することにより樹立可能になった。そこで、我々は癌幹細胞関連腫瘍抗原を標的とした新規腫瘍免疫療法の開発を目的に、iPS 細胞の新規抗腫瘍ワクチン療法への応用の可能性を検討した。まず、GM-CSF 遺伝子導入 iPS ワクチン (iPS/GM-CSF) 細胞を樹立する目的で、非伝播型センダイウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った結果、ワクチン細胞作製時の放射線照射の有無に関わらず、*in vitro* において抗腫瘍効果を誘導するために必要とされる十分量の GM-CSF を産生 (>200 ng/ 10^6 個/ 24 hrs) することを確認した。また、iPS/GM-CSF 細胞には GM-CSF 遺伝子非導入 iPS 細胞と同様の形態学的所見および幹細胞関連マーカー発現を認め、幹細胞性が維持されていることが示唆された。低免疫原性マウス肺癌細胞 (LLC) 担癌同系マウスモデルを用いた予防ワクチン及び治療ワクチン両実験系において、未治療マウス群と比較し有意な予防的抗腫瘍効果を認めた ($p < 0.05$)。一方、同治療経過中、重篤な有害事象を認めなかった。また、予防ワクチン系における生化学所見において、肝腎機能障害を認めなかった。以上の実験結果より、正常皮膚細胞由来 GM-CSF 遺伝子導

入自家 iPS 細胞ワクチン療法が、癌幹細胞を標的とした新規癌免疫療法として有望である可能性が示唆された。

B. 再生医療等開発研究

難治性疾患に対する治療法には遺伝子治療法他に組織幹細胞を用いた再生医療があり、現在集中的に検討がなされてきている。本研究部では特に細胞療法の観点からいくつもの新しい治療法開発に向けた基礎ならびに臨床的取り組みを行ってきている。

a. ヒト胚性幹細胞を用いた高効率造血細胞分化誘導法の検討 (Kawano, H., Nii, T., Miura, Y., Tani, K., *et al.*)

胚性幹細胞 (Embryonic stem cell; ES 細胞) は、全能性多分化能を有する培養細胞であり、近年樹立された人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) とともに、将来的な再生医療における主要な移植細胞源として期待を集めている。しかしながら実際の臨床応用までには、ES/iPS 細胞から目的とした機能性分化細胞へ高効率かつ再現性良く分化誘導を行う系の開発が急務であり、また得られた分化細胞の生体内における安全性と有効性に関する慎重な前臨床研究の蓄積が必要である。このような背景のもと、本研究では血液細胞に焦点を当て、新しい造血幹細胞移植療法開発を目指して、ヒト ES 細胞を用いた高効率造血細胞分化誘導法の検討を行った。

これまでに我々が小型霊長類コモンマーモセット (CM) ES 細胞からマウス由来造血ストローマ細胞の非存在下で造血細胞への誘導能をもつことを明らかにした Ta11/Sc1 遺伝子導入法と、ヒト胎児肝臓 cDNA 発現レンチウイルスベクターライブラリーを用いた CM ES 細胞への遺伝子導入後、コロニー形成の誘導を指標とした一次スクリーニング、これにより得られた候補遺伝子ベクターを用いて *in vitro* での再現性を CM ES 細胞にて確認する二次スクリーニング法を経て選択したヒト造血・血球分化誘導候補遺伝子について、CM ES 細胞を用いた胚葉体 (EB) 形成法により CD34 陽性細胞出現率を指標にヒト ES/iPS 細胞からの造血再構築能を検討している。造血分化への関与が既に知られている数種の遺伝子についてはレンチウイルスベクターにて CM ES 細胞に遺伝子導入を行い、CD34 陽性細胞の割合を FACS にて確認した。Ta11/Sc1 遺伝子については理化学研究所との共同研究により、Ta11/Sc1 遺伝子恒常発現 iPS 細胞株を同室で樹立し、それらの造血幹/前駆細胞への分化誘導能をストローマ細胞との共培養法により確認している。今後免疫不全マウス *in vivo* において長期造血構築能を検討する予定である。

b. 新規遺伝子導入ベクターを用いたヒト iPS 細胞の樹立技術の開発 (Miura, Y., Tani, K. *et al.*)

ヒト iPS (induced pluripotent stem cells) 細胞の開発により線維芽細胞を始めとする自己細胞を用いた再生医療の実現が極めて現実的になってきており、改良や応用技術開発が急速に進んできつつあるものの、安全面および効率面で克服すべき課題が多いことも事実である。九州大学医学研究院ウイルス学教室との共同研究として、麻疹ウイルスベクターを用いたヒト iPS 細胞樹立技術の開発を行っている。麻疹ウイ

ルスは遺伝子操作が簡便で、ウイルス学教室において既にウイルスゲノムの分節化技術が確立されており、一つのベクターで複数の遺伝子搭載が可能で、導入遺伝子発現の効率化が期待できる。さらに麻疹ウイルスには中和抗体、感染阻害ペプチド、効果的なワクチンが存在するなど、臨床応用に向けての基盤を有するウイルスである。複数遺伝子搭載型新規麻疹ウイルスベクターを用いた安全かつ効率的な iPS 細胞樹立技術開発を行い、臨床応用可能な iPS 細胞の樹立を目標としている。

c. p53 変異をもつ非ヒト霊長類コモンマーモセット個体の作製 (Nagai, Y., Marumoto, T., Tani, K. *et al.*)

Zinc finger nucleases (ZFNs) は、近年霊長類細胞において遺伝子破壊を行うことのできる新たな方法として非常に注目されてきている。

我々は、ZFNsを用いて、腫瘍抑制遺伝子であるp53に変異をもつコモンマーモセット個体の作製を行うことを目的とした研究を進めている。これまでの実験で、我々が新たにデザインしたp53遺伝子を標的とするZFNsがp53を破壊する活性をもつことが明らかとなった。今後はこれらのZFNsをコモンマーモセットの受精卵に注入し、p53変異をもつ個体作製を行う予定である。

d. 新規脳腫瘍マウスモデルを用いた悪性神経膠腫発生分子機構の解明 (Marumoto, T., *et al.*)

悪性神経膠腫はその患者予後が約1年程度と極めて悪く、新規治療法の開発は危急の課題である。新規治療法の開発につながる悪性神経膠腫の発生分子機構の解明には、動物モデルが必須のツールである。現在、悪性神経膠腫のマウスモデルとしてはヒトの腫瘍組織や細胞株を免疫不全マウス的大脑に移植するゼノグラフトモデルが広く用いられている。しかしながら、このモデルは再現性が高いものの悪性神経膠腫の最大の特徴である腫瘍細胞の浸潤性を示さないなど、ヒト悪性神経膠腫をよく再現できていないため、よりヒト悪性神経膠腫に近い新たなマウス脳腫瘍モデルの開発が望まれていた。我々は成体のマウス大脑で効率的に目的遺伝子を発現できることができるレンチウイルスベクターを用いて活性化型 H-Ras 癌遺伝子を p53 ヘテロ欠失型マウス大脑で発現させると、悪性神経膠腫と極めて類似した腫瘍が形成されることを発見した。現在、この新規脳腫瘍モデルを用いて悪性神経膠腫形成の分子メカニズムに関する研究を進めているところである。

e. Wnt3a は重症好中球減少症患者より樹立した人工多能性幹細胞由来の障害好中球を成熟させる (Hiramoto, T, Tani, K *et al.*)

遺伝性疾患患者より樹立した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は疾患の病因研究や治療のための創薬研究のための新たなツールとして注目されている。重症先天性好中球減少症 (SCN) は出生後より好中球減少を呈する重篤な疾患である。本疾患の原因として最も高頻度に検出されているのは好中球エラスターゼをコードする ELANE 遺伝子のへ

テロ接合性変異である。しかし適切なモデル動物が存在しないため、本疾患の好中球分化異常機構に関する詳細な解析はなされていない。本研究では、SCN 患者体細胞より iPS 細胞 (SCN-iPS 細胞) を樹立し、その造血能について解析を行った。その結果、SCN-iPS 細胞由来顆粒球分化過程において好中球分化障害が発生し、これら好中球は好中球刺激因子 (G-CSF) への感受性が低く、*in vitro* において SCN の病態を再現することができた。SCN-iPS 細胞と対照 iPS 細胞の顆粒球造血の分子機構について解析を行ったところ、Wnt3a/ β -catenin 経路に関係する遺伝子群 (例: Lymphoid enhancer binding factor-1 (LEF-1)) の発現低下が確認され、Wnt3a タンパクの添加により LEF-1 遺伝子の発現が上昇し、SCN-iPS 細胞由来好中球前駆細胞の成熟を認めた。

以上の結果より、SCN-iPS 細胞は SCN の病因を解析する優れた疾患モデルであり、Wnt3a/ β -catenin 経路の活性化は ELANE 遺伝子異常 SCN の有効な治療法である可能性が強く示された。

f. 新規再生医療および遺伝子治療開発のためのトランスレーショナルリサーチ実施に必須の GMP 準拠試験物作製を可能とする九州大学病院分子・細胞調整センター (KU-MCPC) の開設に向けた基礎および臨床的検討 (Okazaki, T., Tani, K. *et al.*)

各種基準書および手順書からなる GMP (Good manufacturing practice) 文書体系の作製が完了し平成 22 年 12 月 1 日付けで正式に KU-MCPC の運用を開始した。これにより GMP 準拠の試験物製造が可能となった。「RNF43 ペプチドパルス樹状細胞ならびに RNF43 ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第 I 相臨床研究」の GMP 準拠細胞製剤の製造を開始した。また再生医療として先進医療ならびに治験申請を目的とする脂肪幹細胞を用いた構造体の作製を開始した。次世代の無菌管理システムであるアイソレーターユニットを用いた GMP 準拠樹状細胞製剤の製造に向けたプロセスバリデーションを行い、本製剤を用いた臨床研究実施に向けたマスタープランを作成した。KU-MCPC で製造される細胞製剤の品質検査として、九州大学病院に設けられた安全検証ユニットの円滑なる運営のための助言と連携を取りまとめ、製造ユニットと品質管理ユニットとの有機的な機能連携を図った。さらに各種の教育計画書を作成した。すなわち利用者ならびに一般研修希望者を対象とした GMP 教育を開催し、実務者への個別講習として無菌管理、環境菌検査 (浮遊菌/付着菌/落下菌) ならびに施設特殊機器の使用講習会を行った。また品質検査のうち FACS Canto II について、基礎から実務までの使用者講習会を実施した。九州大学病院中央検査部安全性検証ユニットと共同し日本薬局方準拠マイコプラズマ検査法を確立した。また将来的な新規標準化 (薬局方改定) を目指した検査方法の確立に向けた検証試験を企業参加のもと開始した。また将来的に、MCPC 機能の充実により得られるであろう多大な知見を基に、今後の臨床開発が大きく期待される遺伝子治療実現に向けた、各種遺伝子導入用ベクター作製時に問題となりうる核酸の完全除去を目的に、新たな核酸分解も可能な新規滅菌器機開発を産官学連携のもと開始した。

業績目録

原著論文

1. Liao,J.,Marumoto,T., Yamaguchi, S., Okano, S., Takeda, N., Sakamoto, C., Kawano, H., Nii, T., Miyamoto, S., Nagai, Y., Okada, M., Inoue, H., Kawahara,K., Suzuki, A., Miura, Y., Tani, K.Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *Mol Ther* 2013 (in press)
2. Kurita,R.,Suda,N., Sudo,K., Miharada,K., Hiroyama,T.,Miyoshi,H., Tani, K., Nakamura,Y. Establishment of immortalized human erythroid progenitor cell lines able to produce enucleated red blood cells. *PLoS ONE* 2013 (in press)
3. Hiramoto,T.,Ebihara, Y.,Mizoguchi, Y., Nakamura,K., Yamauchi, K., Ueno, K., Nariai, N., Mochizuki, S., Yamamoto, S.,Nagasaki, M., Furukawa, Y., Tani, K., Nakauchi, H., Kobayashi, M., Tsuji, K. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3023-3028,2013.
4. Yokota, Y., Inoue, H., Matsumura, Y., Nabeta, H., Narusawa, M., Watanabe, A., Sakamoto, C., Hijikata, Y., Iga-Murahashi, M., Takayama,K., Sasaki, F., Nakanishi, Y., Yokomizo, T., Tani, K..Absence of LTB4/BLT1 axis facilitates generation of mouse GM-CSF-induced long-lasting antitumor immunological memory by enhancing innate and adaptive immune systems. *Blood* 120:3444-3543, 2012.
5. Miyamoto,S., Inoue , H., Nakamura ,T., Yamada , M., Sakamoto , C., Urata , Y., Okazaki, T., Marumoto, T., Takahashi, A., Takayama,K., Nakanishi, Y., Shimizu, H., Tani,K. Coxsackievirus B3 Is an oncolytic virus with immunostimulatory properties that is active against lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72:2609-2621, 2012.
6. Mizuochi, C., Hirio, Y., Blasch,K., Kikushige,Y., Tani,K., Akashi,K., Tavian,M., Sugiyama, D. Intra-aortic clusters undergo endothelial to hematopoietic phenotypic changes in early embryogenesis. *PLoS ONE* 7:e35763, 2012.
7. Dong, Y., Kobayashi, S., Tian, Y., Ozawa, M., Hiramoto, T., Izawa, K., Bai,Y., Soda, Y., Sasaki, E., Itoh, T., Maru, Y., Oyaizu, N., Tojo, A., Kai, C., Tani, K., Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. *Open J Blood Dis.* 2:1-10, 2012.
8. Somada,S., Muta, H., Nakamura,K., Sun,X., Honda,K., Ihara, E.,Akiho, H., Takayanagi, R., Yoshikai, Y., Podack, E.R., Tani, K.CD30 Ligand/CD30 Interaction is involved in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 57:2031-2037,2012.
9. Hamada, K., Yoshihara, C., Ito, T., Tani,K., Tagawa, M., Sakuragawa,N., Ito, H., Koyama, Y. Antitumor effect of chondroitin sulfate-coated ternary granulocyte macrophage colony- stimulating factor plasmid complex for ovarian cancer. *J Gene Med.* 14:5120-127, 2012.

10. Nunomura, S., Shimada, S., Kametani, Y., Yamada, Y., Yoshioka, M., Suemizu, H., Ozawa, M., Itoh, T., Kono, A., Suzuki, R., Tani, K., Ando, K., Yagita, H., Ra, C., Habu, S., Satake, M., Sasaki, E. . Double expression of CD34 and CD117 on bone marrow progenitors is a hallmark of the development of functional mast cell of *Callithrix jacchus* (common marmoset). *Int Immunol.* 24:593-603, 2012.
11. Hijikata Y, Murahashi-Iga M, Okazaki T, Tanaka Y, Odaira K, Okano S, Hisano T, Takahashi A, Marumoto T, Inoue H and Tani K. Development of novel immune therapies for solid tumors: phase I clinical trials in a single institute. *Rinsho Ketsueki.* 53, 487-92, 2012 (Japanese)

総説

1. Nii T, Marumoto T and Tani K. Roles of p53 in Various Biological Aspects of Hematopoietic Stem Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi: 10.1155/2012/903435. Epub Jun 20, 2012.

学会発表

国際学会

1. Murahashi M, Hijikata Y, Tanaka Y, Inoue H, Marumoto T, Nakanishi Y, Yoshida K, Tsunoda Nakamura, Y, Tani K. Phase I clinical trial of cancer vaccine combined with chemotherapy targeting both tumor antigen and immune tolerance against advanced solid tumors. 37th ESMO Congress, September 2012, Vienna, Austria.
2. Yosuke Yokota, Hiroyuki Inoue, Ayumi Watanabe, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Takehiko Yokomizo and Kenzaburo Tani. Absence of LTB4/BLT1 axis promotes generation of long-lasting antitumor memory responses induced by administration of GM-CSF gene-transduced tumor cells, in a CD4⁺ T cell-dependent manner. *American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.*
3. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Shinji Okano, Saori Yamaguchi, Takenobu Nii, Hiroataka Kawano, Yoko Nagai, Chika Sakamoto, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki and Kenzaburo Tani, Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *American Society of Hematology, 53th Annual Meeting, San Diego, 2011.*
4. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Shinji Okano, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki, Kenzaburo Tani, Efficient generation of induced pluripotent stem cells by the inhibition of PTEN tumor suppressor. *The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global COE International Symposium. Cell Migration in Biology and Medicine, 2012, Fukuoka.*
5. Hiroyuki Inoue, Yasuki Hijikata, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus harboring the wild-type *N*, *P*, *L* Genes (MV-NPL) effectively target lung cancer stem cells. *American Association of Cancer Research,*

- 103th Annual Meeting, Chicago, 2012.
6. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Tomotoshi Marumoto, Atsushi Takahashi, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. American Association of Cancer Research, 103th Annual Meeting, Chicago, 2012.
 7. Keisuke Yasunari, Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Oncolytic Echovirus 4 as a potent virotherapy agent against human esophageal squamous cell carcinoma. American Society of Gene and Cell Therapy, 15th Annual Meeting, Philadelphia, 2012.
 8. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Akira Sakamoto, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Yumiko Matsumura, Takafumi Nakamura, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered Measles virus Edmonston strain expressing the wild-type *N*, *P*, *L* Genes (MV-NPL) is a promising oncolytic virotherapy agent against lung cancer stem cells. American Society of Gene and Cell Therapy, 15th Annual Meeting, Philadelphia, 2012.
 9. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus lyses non-small cell lung cancer stem cells *in vitro* and *in vivo*. Asian Pacific Lung Cancer Conference, 5th Annual Meeting, Fukuoka, 2012.
 10. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Yumiko Matsumura, Shohei Miyamoto, Akira Sakamoto, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Genetically engineered oncolytic measles virus effectively targets and kills non-small cell lung cancer stem cells. Asian Pacific Society of Respiriology, 17th Annual Meeting, Hong Kong, 2012.
 11. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto,, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiko Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura, Kenzaburo Tani. Characterization of dysgerminoma like tumors arose in the process of generating common marmoset induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research, (ISSCR), 10th Annual Meeting, Yokohama, 2012.
 12. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hirotaka Kawano, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Yoshie Miura, Jiyuan Liao, Michiyo Okada, Kenzaburo Tani. Efficient hematopoietic differentiation of common marmoset embryonic stem cells by the inhibition of PI3K-AKT pathway. International Society for Stem Cell Research, (ISSCR), 10th Annual Meeting, Yokohama, 2012.
 13. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Shinji Okano, Naoki Takeda, Chika Sakamoto, Hirotaka Kawano, Takenobu Nii, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Yoshie Miura, PhD1, Shinya Shimoda, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Ken-ichi Yamamura, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki, and Kenzaburo Tani. Efficient generation of induced pluripotent stem cells by the use of Pten inhibitor. International Society for Stem Cell Research, (ISSCR), 10th Annual Meeting, Yokohama, 2012.

国内学会

1. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 (CVB3) as a Novel Oncolytic Virotherapy Agent against Non Small Cell Lung Cancer. 第 52 回日本肺癌学会総会, 大阪, 2011
2. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Meiko Yamada, Takafumi Nakamura, Nosaki Kaname, Urata Yasuo, Koichi Takayama, Hiroyuki Shimizu, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an Oncolytic Virus Active Against Non-Small Cell Lung Cancer, 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会, 神戸, 2012
3. Hiroyuki Inoue, Akira Sakamoto, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic Edmonston strain of measles virus elicits remarkable oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
4. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Coxsackievirus B3 is an immunostimulatory oncolytic virus active against lung adenocarcinoma. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
5. Hiroyuki Inoue, Shohei Miyamoto, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. 非小細胞肺癌に対するコクサッキーウイルス B3 を用いた新規腫瘍溶解性ウイルス療法, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 札幌, 2012
6. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Yosuke Yokota, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Koichi Takayama, Makoto Inoue, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. TLR7 ligand Imiquimod enhances GM-CSF-induced immunological antitumor effect. 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 金沢, 2012
7. 土方 康基, 岡崎 利彦, 田中 芳浩, 小林 慎一, 村橋 睦了, 山田 一成, 丸本 朋稔, 井上 博之, 谷 憲三朗, A phase I study of adoptive immunotherapy using autologous dendritic cell pulsed with a RNF43 peptide in patients with advanced solid tumors. 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 金沢, 2012
8. 村橋 睦了, 土方 康基, 田中 芳浩, 岸本 淳司, 井上 博之, 丸本 朋稔, 高橋 淳, 岡崎 利彦, 平川 雅和, 岡野 慎士, 谷 憲三朗, Multi-peptide immune responses to cancer vaccine after cyclophosphamide correlated with longer survival of the patients with advanced solid tumors, 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会, 金沢, 2012
9. 土方康基, 岡崎利彦, 田中芳浩, 大平公亮, 小林慎一, 村橋睦了, 高橋淳, 丸本朋稔, 井上博之, 吉田浩二, 角田卓也, 谷憲三朗, 進行固形腫瘍患者に対する化学療法併用新規免疫細胞療法臨床研究, 第 50 回日本癌治療学会学術集会, 横浜, 2012
10. 宮原 裕, 村橋睦了, 山田一成, 土方康基, 井上博之, 丸本朋稔, 松田めぐみ, 谷 憲三朗,

塩化ナトリウム内服で改善した中枢性塩類喪失症候群 (Cerebral Salt Wasting Syndrome: CSWS) の 1 例, 第 300 回日本内科学会九州地方会, 福岡, 2013

11. Ayumi Wanatabe, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Keisuke Okita, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi, Shinya Yamanaka and Kenzaburo Tani. Novel cancer immunotherapy using induced pluripotent stem cells genetically engineered to produce GM-CSF. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
12. Megumi Narusawa, Hiroyuki Inoue, Chika Sakamoto, Ayumi Watanabe, Shohei Miyamoto, Makoto Inoue, Koichi Takayama, Mamoru Hasegawa, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Plasmacytoid DCs are involved in an antitumor immunity induced by GM-CSF gene-transduced tumor cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
13. Hiroyuki Inoue, Keisuke Yasunari, Shohei Miyamoto, Yumiko Matsumura, Kaname Nosaki, Akira Sakamoto, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi and Kenzaburo Tani. Novel engineered oncolytic measles virus shows oncolytic activity against non-small cell lung cancer stem cells. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
14. Shohei Miyamoto, Hiroyuki Inoue, Beibei Wang, Keisuke Yasunari, Chika Sakamoto, Megumi Narusawa, Takafumi Nakamura, Meiko Yamada, Yasuo Urata, Koichi Takayama, Yoichi Nakanishi, Hiroyuki Shimizu and Kenzaburo Tani. Immunostimulatory coxsackievirus B3 as a potent oncolytic agent against non-small cell lung carcinoma. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012
15. Saori Yamaguchi, Tomotoshi Marumoto, Takenobu Nii, Hirotaka Kawano, Jiyuan Liao, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Atsushi Takahashi, Hiroyuki Inoue, Erika Sasaki, Shinji Okano, Yoshie Miura and Kenzaburo Tani. Characterization of common marmoset dysgerminoma-like tumors generated by the transduction of reprogramming factors. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
16. Takenobu Nii, Tomotoshi Marumoto, Hirotaka Kawano, Saori Yamaguchi, Yoko Nagai, Yoshie Miura, Jiyuan Liao, Michiyo Okada, Kenzaburo Tani. Efficient hematopoietic differentiation of common marmoset embryonic stem cells by the inhibition of PI3K-AKT pathway. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
17. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Shinji Okano, Naoki Takeda, Chika Sakamoto, Hirotaka Kawano, Takenobu Nii, Yoko Nagai, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Shinya Shimoda, Hiroyuki Inoue, Atsushi Takahashi, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Ken-ichi Yamamura, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki and Kenzaburo Tani. Highly efficient generation of induced pluripotent stem cells by the inhibition of PTEN tumor suppressor. 第 18 回日本遺伝子治療学会, 熊本, 2012
18. Jiyuan Liao, Tomotoshi Marumoto, Saori Yamaguchi, Shinji Okano, Hirotaka Kawano, Takenobu Nii, Yoko Nagai, Chika Sakamoto, Michiyo Okada, Yoshie Miura, Hiroyuki Inoue, Masato Tanaka, Kaori Nagatoshi, Kohichi Kawahara, Akira Suzuki and Kenzaburo Tani. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. 九州大学グローバル COE・生体防御医学研究所 国際シンポジウム若手発表会, 福岡, 2012

エピゲノム学分野

Division of Epigenomics

教授：佐々木 裕之

Professor : Hiroyuki Sasaki, M.D., Ph.D.

平成 24 年度の当分野では、主幹教授・佐々木裕之、准教授・佐渡敬、助教・一柳健司、助教・鶴木元香、特任講師・藤英博の体制で研究・教育に臨んだ。佐々木は4月に所長に任命され、また学内共同教育研究施設・エピゲノムネットワーク研究センターのセンター長を務めている。これらの教員に加え、学術研究員3名、研究生1名、博士課程学生6名、修士課程学生4名、生命科学科4年生2名、テクニカルスタッフ1名、実験補助1名、秘書2名の計25名が研究活動に参加した。

当分野は哺乳類の生体恒常性維持やリプログラミングに重要なエピジェネティクスおよびエピゲノムの制御機構の解明を中心的な研究テーマに据え、とくに生殖細胞におけるゲノムインプリンティングのリプログラミング、X染色体不活性化の機構、エピジェネティクスによるゲノム安定性維持、エピゲノムと種間・種内多様性、ヒトのエピゲノム異常に基づく疾患の解明などを目的として研究している。

A. 生殖細胞系列におけるゲノム刷り込みのリプログラミング機構

ゲノム刷り込み（インプリンティング）は、哺乳類の精子・卵子のゲノムが異なるエピジェネティックな修飾を受け、その結果として子の遺伝子の一部が父由来または母由来アレルに特異的な発現を示すことをいう。インプリンティングを受ける遺伝子は生物学的に重要で、ヒトの雄核発生、単為発生がそれぞれ完全胞状奇胎、卵巣奇形腫に終わるのはこのためであり、またインプリンティング異常はさまざまな先天性疾患、がんなどを引き起こす。我々はマウスを用いて、このインプリンティングが世代毎にリプログラムされる機構を研究している。これまでに、父母由来を区別するエピジェネティックな修飾（以下インプリント）の実体が DNA メチル化であること、雌雄の配偶子形成過程でインプリントを確立する de novo DNA メチル化酵素は Dnmt3a であることを明らかにしてきた(総説 Tomizawa & Sasaki, J. Hum. Genet. 2012)。

今年度は、マウス卵子において H19 遺伝子のインプリンティング制御領域から生成される小分子 RNA はインプリンティングに関係ないこと（原著論文 Takahashi et al. Gene 2012）、インプリントの維持に必要な KRAB-zinc finger タンパク質 Zfp57 が特定の配列中の CpG メチル化を認識することを明らかにした（原著論文 Liu et al. Genes Dev. 2012）。一方、DNA メチル化酵素のノックアウトマウスの解析から、卵子におけるインプリンティング過程に DNA メチル化以外のエピジェネティックな修飾が関与す

るという知見を得て、現在投稿準備を進めている。

B. 生殖細胞系列における piRNA の生合成機構の研究

Piwi-interacting RNA (piRNA) は一本鎖 RNA から未知の機構で生成される生殖細胞特異的な小分子 RNA で、Piwi ファミリータンパク質と結合して、主にレトロトランスポゾンのサイレンシングに関わる。piRNA にはプロ精原細胞（ゴノサイトとも呼ばれる）で産生されるものとパキテン期精母細胞で産生されるものがある。今回、パキテン期 piRNA の前駆体 RNA の転写単位（piRNA クラスター）内に外来性の DNA 断片を導入し、この断片から piRNA が作られるか、また、そのようにしてできた piRNA は相補的な配列を持つ mRNA をサイレンシングするか調べた。その結果、piRNA クラスターの一部として転写された外来性断片から piRNA が作られること、その piRNA はレポーター遺伝子をサイレンシングすることが確認でき、生殖細胞特異的な遺伝子ノックダウンが可能であることが分かった（原著論文 Yamamoto et al. Genome Res. 2013）。

また我々は以前、フォスフォリパーゼ D/ヌクレアーゼファミリーのメンバーである MitoPLD/Zucchini/Pld6 蛋白質が精巣内生殖細胞における piRNA の合成、Rasgrf1 遺伝子のメチル化、及び正常な精子形成に必須であることを報告した。しかし MitoPLD をノックアウトした雌マウスは正常な妊性を示し、肉眼的な異常は見つかっていなかった。今回、MitoPLD ノックアウト卵子の詳細な解析を行ったところ、レトロトランスポゾン的一种である L1 由来の piRNA の生成が著しく阻害されていることが判明した。現在、さらに詳しい解析を行っている。

C. エピジェネティクス異常に基づく遺伝病の解析

ICF 症候群は、免疫不全、セントロメア不安定性、顔貌異常を主徴とする劣性遺伝病で、de novo DNA メチル化酵素のひとつである DNMT3B の遺伝子変異で生じる。しかしながら、ICF 症候群には DNMT3B 遺伝子に変異のない一群の症例が存在することがわかっていた（2型 ICF 症候群）。この新規原因遺伝子同定に向けて網羅的なエクソーム解析を行ったところ、日本の 2 家系と海外の 1 家系で ZBTB24 遺伝子に変異が同定された（フランスとの共同研究）。これと時期を同じくして、オランダの 2 型 ICF 症候群症例で ZBTB24 遺伝子に変異があることが報告された。ZBTB24 は転写抑制作用を持つ一群の核内タンパク質のメンバーであるが、その機能の詳細は不明である。現在、この遺伝子が原因遺伝子であることを確定させ、表現型との関わりを解明するため、様々な実験を行っている。

D. メチローム解析・エピゲノム解析

微量サンプルに適用可能な post-bisulfite adaptor tagging 法（PBAT 法）（東大・

伊藤隆司らが開発)を用いて、ゲノム網羅的な DNA メチル化解析 (メチローム解析)を開始した。マウス卵殻胞期の卵子 1000 個を用いて解析したところ、CpG メチル化を超える数の non-CpG メチル化が存在すること、non-CpG メチル化は CpG メチル化と共に de novo メチル化酵素 Dnmt3a とその制御因子 Dnmt3L により卵成長期に導入されることが明らかになった (原著論文 Shirane et al. PLoS Genet. 2013)。また、DNA 複製の起こらない卵成長期には作用しないと考えられていた維持メチル化酵素 Dnmt1 が、de novo メチル化過程でヘミメチル化状態のまま残された CpG 部位をフルにメチル化することも明らかになった。さらに京大・斎藤通紀らとの共同研究により培養下で胚性幹細胞から作成された生殖細胞様細胞及びそこに至る途中の細胞、横浜市大・大保和之らとの共同研究により精子幹細胞と前駆細胞のメチローム解析も開始した。最後に、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業の支援を受け国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) に貢献するため、東北大・有馬隆博、成育医療セ・秦健一郎、及び当研究所情報生物学分野・須山幹太との共同研究により、ヒトの胎盤や子宮内膜から数種類の細胞を純化しメチロームを含めてそれらのエピゲノム解析を決定するプロジェクトを開始した。

E. 配列特異的な DNA メチル化可視化法の開発

東大・岡本晃充らが開発した inter-strand complexes formed by osmium and nucleic acids (ICON) プローブを利用して、高度に直列型に反復した配列であるサテライト DNA のメチル化状態を配列特異的に可視化する方法を開発した。この方法では、まず fluorescence in situ hybridization (FISH) の原理で ICON プローブを標的配列にハイブリダイズし、プローブ中のビピリジンをオスミウムを介してメチル化されたシトシンと特異的に架橋する。架橋されなかったプローブを除去・洗浄するとメチル化されたシトシンのみシグナルが得られる。我々はこの方法を MeFISH と名付け、様々なエピジェネティクス研究への応用を期待している (投稿準備中)。

F. X 染色体の活性制御機構の研究

a. X 染色体不活性化をモデルとしたヘテロクロマチン形成機構の解析

哺乳類の雌は 2 本の X 染色体の片方を不活性化することで、X 染色体を 1 本しかもたない雄との間の遺伝子量の不均衡を是正する。Xist は不活性 X 染色体から特異的に転写される非コード RNA で、X 染色体不活性化の開始に必須なことが示されているが、これがどのようにして染色体ワイドの不活性化を引き起こすかについて詳しいことはよくわかっていない。私たちは Xist RNA がどのようにクロマチン凝縮を引き起こし、遺伝子発現を抑えるのかを知るために、ジーンターゲットングによって作製したアレルから発現する変異 Xist RNA が招く X 染色体不活性化の異常を個体・細胞レベル、お

よび分子レベルで解析している。その変異の一つは Xist の部分的機能欠損と考えられ、X 染色体不活性化を開始することはできるものの、それを維持することができない。この変異 Xist RNA によって不活性化を開始した X 染色体は正常な DNA メチル化パターンを構築できないことが示唆された。また、別のアレルから発現される変異 Xist RNA はほとんど不活性化を引き起こせないにもかかわらず、不活性 X 染色体に特徴的なヒストンのエピジェネティック修飾は野生型 Xist RNA と同等に構築できることがわかってきている。このような変異型 Xist RNA が招く X 染色体不活性化の異常を詳細に調べることで、どのようなエピジェネティック制御がヘテロクロマチン形成に寄与しているか明らかにしていきたいと考えている。

b. 不活性 X 染色体に局在する蛋白質の解析

不活性 X 染色体に局在する蛋白質やそれを含む複合体に着目し、それらが Xist RNA の機能発現、すなわち X 染色体への局在やそのヘテロクロマチン化にどのような効果をもつか調べている。アイソフォームの改変を含む 6 種類の遺伝子改変マウスを作製、あるいは外部より入手し、それらの胚発生過程における X 染色体不活性化への影響を解析している。2 つの因子についてはアイソフォームの変異を含め単独では X 染色体不活性化に直接の影響はないことがわかってきたが、これらの蛋白質と相互作用する因子の変異と組み合わせた場合はどうか、遺伝学的相互作用の有無を検討している。他のものについては、ようやく解析を始める準備が整った段階で、今後交配を開始し、遺伝学的、生化学的、細胞生物学的解析を行い X 染色体不活性化への影響を調べる。表現型が認められたものについては、さらには次世代シーケンサーを用いたエピゲノム解析も行う予定である。

G. レトロトランスポゾンの機能制御の解析

SINE や LINE といったレトロトランスポズンは哺乳類ゲノムの 40% を占める転移因子であり、宿主のゲノム多様性をもたらす主役因子である一方、ゲノム機能の制御にも深く関与している。通常、レトロトランスポゾンの転写は DNA メチル化などによる抑制を受けているが、生殖細胞形成期にはダイナミックに変化する。我々は SINE 配列の DNA メチル化機構を解析し、これらは胎生期生殖細胞においてメチル化されること、それは piRNA には依存しないことなどを明らかにした。また、雄性生殖細胞では一過的に SINE 配列上の非 CG 配列もメチル化されることを発見した。非 CG 配列のメチル化は ES 細胞、iPS 細胞、卵子などにも見られる修飾であるが、この修飾は細胞分裂の休止期間にのみ増加し、細胞分裂の再開に伴って消えていく「維持されない修飾」であることを証明した (原著論文 Ichiyanagi et al. *Nucleic Acids Res.* 2013)。次いで、クロマチン状態を区画化する SINE を発見し、この SINE の有無によって近傍遺伝子の

発現が制御されていることを明らかにした。現在、その分子機構を解析している。さらに、遺伝学的な解析から、分子シャペロンである熱ショック蛋白質が piRNA の産生経路に関わり、piRNA や DNA メチル化を通して LINE の活性を制御していることを明らかにしつつある。

H. 哺乳類におけるエピゲノムの種内および種間多型の解析

エピジェネティックな状態の個体差が生物の多様性や進化にどのような影響を与えるのかを明らかにするため、高速シーケンサーを用いてヒト科4種（ヒト、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン）の DNA メチル化エピゲノムの比較解析を行っている。種特異的な DNA メチル化は遺伝子発現を変化させ、またマイクロサテライトや CTCF 蛋白質結合配列の塩基配列多型と強く関連していることを明らかにした。これは、ゲノムとエピゲノムが相互作用しながら進化してきたことを示唆している（論文投稿中）。また、マウス亜種間で DNA メチル化状態が異なる領域を同定し（肝臓と精子）、さらに F1 雑種を解析して、多くの場合は DNA メチル化状態の差異はシス配列によって規定されていることを明らかにした。今後、どのような配列変化がメチル化変化を引き起こすのかを明らかにし、ゲノム・エピゲノム関連の法則性に迫りたい。

I. 新規ヒストン修飾「水酸化」の発見と責任酵素の同定

我々は UHRF1 をメチル化 DNA 認識タンパクとして同定して以来、このタンパク質の機能解析を続けており、UHRF1 がリジン水酸化酵素 JMJD6 と結合する事を見出した。UHRF1 はヒストン近傍で機能しているため、UHRF1 複合体に含まれる JMJD6 がヒストンタンパク質のリジン残基を水酸化するかどうかを検討した。In vitro で JMJD6 はヒストンタンパク質のリジン残基を水酸化し、この水酸化はヒストンのアセチル化修飾及びメチル化修飾と拮抗する事が分かった。免疫遺伝学分野の福井宣規主幹教授から御提供頂いた Jmjd6 ノックアウトマウス胎仔を用いた検討で、in vivo で Jmjd6 がヒストンのリジン残基の水酸化をおこなっていることを証明した（原著論文 Unoki et al. J. Biol. Chem. 2013）。現在、Jmjd6 が水酸化するヒストンのリジン残基の特定を進めている。ヒストンのリジン残基の水酸化は新規のヒストン修飾であり、エピジェネティックな転写制御機構の更なる理解につながると考えている。

J. Uhrf1 が生殖細胞形成過程におけるリプログラミングに果たす役割の解明

Uhrf1 は DNA メチル化を母親細胞から娘細胞へ伝達する上で重要な役割を果たしており、Uhrf1 のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死であることから、Uhrf1 はマウスの初期発生に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、生殖細胞形成過程における Uhrf1 の役割は不明である。そこで、私たちは卵子特異的および

始原生殖細胞特異的に Cre を発現する Uhrf1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。卵子特異的に Uhrf1 をノックアウトした卵子と野生型の精子を受精させると、ほとんどの胚は着床前に致死となった。また始原生殖細胞特異的に Uhrf1 をノックアウトした雄マウスの精巣には生殖細胞が認められず、Uhrf1 は精子形成過程においても重要な働きをしていることが示唆された。現在、Uhrf1 が雌雄生殖細胞の形成過程で、どのような役割を担っているのかの解明を進めている。

K. 初期発生に関わる新規 KRAB-zinc finger タンパク質の同定

KRAB-zinc finger タンパク質である Zfp57 は、初期発生においてメチル化されたインプリンティング制御領域 (ICR) に局在し、受精直後のリプログラミング時に起こるゲノムワイドな DNA 脱メチル化から ICR のメチル化を保護する上で重要な役割を担っていることが報告されている。しかしながら、Zfp57 がすべての ICR のメチル化を保護する訳ではなく、その他の KRAB-zinc finger タンパク質がこの機構に含まれる可能性がある。私たちは過去に発表されたマイクロアレイデータを利用し、卵子および受精卵で発現が高い KRAB-zinc finger タンパク質を 11 個同定した。現在、これらのタンパク質が ICR に結合するか、またこれらのタンパク質をノックアウトした場合に初期発生に影響を与えるかを検討中である。

業績目録

原著論文

1. Takahashi, T., Matsuzaki, H., Tomizawa, S., Okamura, E., Ichiyangi, T., Fukamizu, A., Sasaki, H. and Tanimoto, K. 2012.
Sequences in the H19 ICR that are transcribed as small RNA in oocytes are dispensable for methylation imprinting in YAC transgenic mice.
Gene 508, 26-34.
2. Liu, Y., Toh, H., Sasaki, H., Zhang, X. and Cheng, X. 2012.
An atomic model of ZFP57 recognition of CpG methylation within a specific DNA sequence.
Genes Dev. 26, 2374-2379.
3. Kofunato, Y., Kumamoto, K., Saitou, K., Hayase, S., Okayama, H., Miyamoto, K., Sato, Y., Katakura, K., Nakamura, I., Ohki, S., Koyama, Y., Unoki, M. and Takenoshita S. 2012.
UHRF1 expression is upregulated and associated with cellular proliferation in colorectal cancer.
Oncol Rep. 28, 1997-2002
4. Arita, K., Isogai, S., Oda, T., Unoki, M., Sugita, K., Sekiyama, N., Kuwata, K., Hamamoto, R.,

- Tochio, H., Sato, M., Ariyoshi, M. and Shirakawa M. 2012.
Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 12950-12955.
5. Ichianagi, T., Ichianagi, K., Miyake, M. and Sasaki, H. 2013.
Accumulation and loss of asymmetric non-CpG methylation during male germ-cell development.
Nucl. Acids Res. 41, 738-745.
6. Yamamoto, Y., Watanabe, T., Hoki, Y., Shirane, K., Li, Y., Ichianagi, K., Kuramochi-Miyagawa, S., Toyoda, A., Fujiyama, A., Oginuma, M., Suzuki, H., Sado, T., Nakano, T. and Sasaki, H. 2013.
Targeted gene silencing in mouse germ cells by insertion of a homologous DNA into a piRNA generating locus. **Genome Res.** 23, 292-299.
7. Unoki, M., Masuda, A., Dohmae, N., Arita, K., Yoshimatsu, M., Iwai, Y., Fukui, Y., Ueda, K., Hamamoto, R., Shirakawa, M., Sasaki, H. and Nakamura, Y. 2013.
Lysyl 5-Hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6).
J. Biol. Chem. (in press)
8. Shirane, K., Toh, H., Kobayashi, H., Miura, F., Chiba, H., Ito, T., Kono, T. and Sasaki, H. 2013.
Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases.
PLoS Genet. (in press)

総説

1. Tomizawa, S. and Sasaki, H. 2012.
Genomic imprinting and its relevance to congenital disease, infertility, molar pregnancy and induced pluripotent stem cells
J. Hum. Genet. 57, 84-91.
2. 新田洋久, 佐々木裕之. 2012.
エピジェネティクスとは?
チャイルドヘルス Vol.15, No.3, 4-5.
3. 酒田祐佳, 佐渡敬. 2012.
X染色体不活性化: RNAによるエピジェネティックな発生制御
実験医学 30, 2908-2915.
4. Mori, T., Ikeda, D.D., Yamaguchi, Y., Unoki, M. and NIRF Project. 2012.
NIRF/UHRF2 occupies a central position in the cell cycle network and allows coupling with the epigenetic landscape.
FEBS Lett. 586, 1570-1583.

5. Sado, T. and Brockdorff, N. 2013.
Advances in understanding chromosome silencing by the long non-coding RNA Xist.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci., 368(1609):20110325.

著書

1. 佐々木裕之. 2012
第 22-17 章: エピジェネティクス
第 22-18 章: DNA メチル化
第 22-19 章: ゲノムインプリンティング
進化学事典 (日本進化学会編), 753-759, 共立出版.

学会発表 (口演のみ)

1. Hiroyuki Sasaki (2012.4.22)
Identification of DNA methylation differences correlated with transcriptional divergence between humans and chimpanzees in chromosomes 21 and 22.
The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases/The 7th Annual Conference of Asian Epigenome Alliance, Shanghai, China.
2. Hiroyuki Sasaki (2012.4.24)
Genomic imprinting, DNA methylation and small RNA in mouse germ cells, Epigenetics, Chromatin, & Transcription.
Cold Spring Harbor Asia Conferences, Suzhou, China.
3. Hiroyuki Sasaki (2012.5.31)
Genomic imprinting, DNA methylation and small RNA in mouse germ cells,
Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the JSDB & The 64th Annual Meeting of the JSCB, Kobe, Japan.
4. 酒田祐佳, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2012.7.18)
変異型 Xist RNA が招く X 染色体不活性化の異常
第 14 回日本 RNA 学会年会, 仙台.
5. Kenji Ichiyanagi (2012.8.1)
Interactions between SINEs and host epigenome in the mouse germline development. 61st Fujihara Seminar "A New Horizon of Retroposon Research", Kyoto, Japan.
6. 鵜木元香 (2012. 8. 25.)
エピジェネティック制御機構に関わるタンパク質相互作用の研究～UHRF1 から広がるエピジェネティクスネットワーク研究～
福島医学会学術研究集会シンポジウム NIRF が拓く医学の未来 福島で生まれた最新科

- 学を世界へ (第 1 回 スタートアップ・シンポジウム)
7. 佐渡敬 (2012.9.21)
Epigenetic Regulation of the Mammalian X chromosome.
第 71 回 日本癌学会学術総会, 札幌.
 8. Hiroyuki Sasaki (2012.9.24)
DNA methylation and small RNA in transposon silencing and imprinting in mouse germ cells.
公開国際シンポジウム「Epigenomic regulation of cell fate determination and homeostasis(多様な生物における細胞の運命決定・恒常性維持とエピゲノム制御),
日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡.
 9. 佐渡敬 (2012.9.26)
Xist RNA の作用機序解明へ向けた遺伝学的アプローチ
ワークショップ, 日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡.
 10. 中島達郎, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2012.9.25)
Xist の部分的機能欠損アレルによって不活性化を開始した X 染色体の CpG メチル化.
日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡.
 11. 酒田祐佳, 保木裕子, 佐々木裕之, 佐渡敬 (2012.9.25)
変異型 Xist RNA による不活性化クロマチンドメインの形成
日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡.
 12. 鶴木元香, 益田晶子, 堂前直, 福井宣規, 有田恭平, 浜本隆二, 岩井裕希子, 白川昌宏,
佐々木裕之, 中村祐輔 (2012.9.25)
ヒストン水酸化酵素としての JMJD6 の同定
日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡.
 13. 福田溪, 一柳健司, 平井啓久, 佐々木裕之 (2012.9.25)
ヒトとチンパンジーのゲノムワイドな DNA メチル化比較
日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡.
 14. 一柳朋子, 三宅美保, 佐々木裕之, 一柳健司 (2012.9.26)
マウス生殖細胞形成における非 CG 配列の DNA メチル化レベルのダイナミックな変動
日本遺伝学会第 84 回大会, 福岡.
 15. 佐々木裕之(2012.10.25)
ヒトの進化と病気におけるエピゲノム.
日本人類遺伝学会第 57 回大会, 東京.
 16. Hiroyuki Sasaki (2012.11.06)
Genomic imprinting, DNA methylation and small RNAs in mammalian germ cells.
International Symposium on Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate, Kyoto, Japan.
 17. 一柳健司 (2012.11.7)

霊長類の表現型多様性におけるゲノムとエピゲノムのクロストーク
第 21 回日本 DNA 多型学会公開シンポジウム, 京都.

18. Hiroyuki Sasaki (2012.11.27)
Genomic imprinting, DNA methylation and small RNA in mammalian germ cells.
13th FAOBMB Congress 2012, "Discovery of Life Processes: From Biomolecules to Systems Biology", Bangkok, Thailand.
19. 佐々木裕之 (2012.11.30)
ゲノムインプリンティングと先天性疾患と細胞リプログラミング.
第 55 回日本甲状腺学会学術集会 基礎甲状腺学セミナー, 福岡.
20. Hiroyuki Sasaki (2012.12.11)
Genomic imprinting, DNA methylation and small RNA in mammalian germ cells.
シンポジウム「Epigenetics and Cytogenetics-bases for complexity and diversity of living organisms」第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
21. 福田溪, 一柳健司, 平井啓久, 佐々木裕之 (2012.12.11)
ヒトとチンパンジーのゲノムワイドな DNA メチル化比較.
ワークショップ「生物進化への新しいアプローチ」第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
22. 佐渡敬 (2012.12.14)
Xist RNA の機能欠損を用いた X 染色体不活性化機構の解析.
ワークショップ「染色体不活性化の生物学」第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡.
23. Takashi Sado (2012.12.15)
Xist RNA defective in chromosome silencing in the mouse
シンポジウム「Non-coding RNAs: Master regulators of biological functions」第 85 回日本生化学会大会, 福岡.
24. 佐々木裕之(2012.12.15)
ゲノムインプリンティングのバイオロジーと高次エピゲノム制御.
シンポジウム「生命活動における高次エピゲノム制御の分子基盤」第 85 回日本生化学会大会, 福岡.
25. 坂口武久 (2013.3.8)
macroH2A 及びその新規ホモログの機能解析.
第 1 回ヒストンバリエーション研究会, 福岡.
26. 佐々木裕之 (2013.3.10)
ゲノムインプリンティングの基礎と生殖再生医学.
日本生殖再生医学会第 8 回学術集会, 東京.
27. 佐々木裕之 (2013.3.11)
哺乳類のエピジェネティクスと生体の恒常性維持.

リスクサイエンス研究フォーラム 2013, 福岡.

28. 佐々木裕之 (2013.3.22)

発生・生殖におけるゲノムの化学修飾と遺伝子機能.

特別企画講演「細胞機能を機動させる分子「核酸」の分野横断的最先端研究」日本化学会
第 93 春季年会(2013), 京都.

ゲノム腫瘍学分野

Division of Cancer Genetics

教授：鈴木 聡

Professor : Akira Suzuki, M.D., Ph.D.

がんは死因の第1位であり、かつ依然増加の一途をたどり、人類にとって最も脅威な疾患である。我々は分子生物学、細胞生物学・発生工学等の技術を駆使して、「**がん関連遺伝子の機能とその異常による疾患解明**」の研究を行っている。

多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常は、がんの発症進展のみならず、がん以外の多くの主要な疾患の発症や、個体の発生分化にも深く関わっていることが分かってきた。このことから、がん関連遺伝子研究は生活習慣病等の多くの疾患の治療法開発につながることを期待される。

私たちはこれらがん関連遺伝子の中でも、がん抑制遺伝子の代表格である p53 や PTEN、また最近注目されつつある Hippo 経路の機能やその制御機構を解析し、新規治療薬開発にも取り組んでいる。

我々の研究によって、がんを含む多くの疾患の発症・進展機構が解明されるとともに、新規治療薬を開発して、医療に貢献したい。

2011 年度の人事異動としては、修士課程の森川拓海君が卒業して就職した。

A. Hippo 経路遺伝子群の機能解析研究

細胞間コミュニケーションには、液性因子起因性シグナルと細胞接触起因性シグナルが大切である。液性因子シグナルはこれまで飛躍的に解析されてきたものの、細胞接触シグナルはまだ不明な点が多い。特に隣の細胞と接触する事によって細胞増殖が抑制される接触抑制現象（コンタクトインヒビション）は古くから知られていたものの、その分子機構は未だ殆ど不明であった。近年接触抑制シグナルの鍵経路として Hippo キナーゼ経路が脚光を浴びている。

Hippo 経路はショウジョウバエにおいて初めて見出され、接触抑制、細胞増殖、細胞死、細胞競合、幹細胞維持、上皮間葉転換、器官サイズの制御シグナルとして注目されている。生化学的には細胞接触やストレス刺激後に、MST キナーゼが活性化された後、LATS キナーゼが活性化され、活性化した LATS キナーゼは、細胞増殖に正に働く転写共役因子 YAP1/TAZ をリン酸化して、核から排除し、或いは蛋白質崩壊に導くことによって、主に細胞増殖に作用する標的遺伝子の転写を負に制御する。しかしながら哺乳類では Hippo 経路各分子の相同分子が極めて多い為に Hippo キナーゼ経路上のどの分子がど

の作用に最も大切であるかを明らかにすることが急務である。さらにこれまでに作製された Hippo 経路遺伝子欠損マウスの多くは胎生早期に致死であったため、成体における各 Hippo 経路分子の生理的役割やその破綻による腫瘍発症の有無の多くが不明である。そこで我々は接触抑制の鍵経路である Hippo キナーゼ経路に興味を持ち、この経路の 4 つのコアコンポーネントの 1 つである MOB1 の機能を解明するために、その欠損マウスを作製することとした。

MOB1 全身完全欠損マウスは、原始内胚葉への分化障害を示して、着床直後に死亡することから、MOB1 は発生に必須な分子であることを明示した。次に MOB1 全身部分欠損マウスを長期観察したところ、皮膚外毛鞘がんを全例にみる他に、骨肉腫(24%)、線維肉腫(22%)、肝がん(19%)、乳がん(16%)、肺がん(5%)、唾液腺癌(5%)の発症をみたことから、MOB1 ががん抑制遺伝子として作用することも証明した。

次にタモキシフェン誘発性ケラチノサイト特異的 MOB1 完全欠損マウスを作製したところ、増殖亢進、細胞死抵抗性、接触抑制障害、前駆細胞増加と自己複製能亢進、中心体の増加をみ、マウスはタモキシフェン投与後 3 週間で口腔粘膜肥厚のために死亡した。生化学的には、LATS1/2 のリン酸化低下の他に、LATS1/2 蛋白質自体も減少し、その他 YAP 蛋白質の活性化(蛋白質量や核局在の増加;リン酸化の低下)もみた。さらにヒト外毛根鞘がんの半数の症例で MOB1 蛋白質の発現の著減を、70%以上の症例で YAP1 蛋白質の活性化をみ、MOB1 の発現が著減したものには全例 YAP1 の活性化をみた。このことから、これまで原因が不明であった外毛根鞘がんの原因遺伝子を特定することができた。

我々の発見は、今後新規治療薬開発に有用となるとして、多くの新聞で広く報道された。

B. リボソーム-p53 経路(核小体ストレス経路)制御分子の機能解析研究

我々は、PICT1(GLTSCR2)がリボソーム蛋白質 L11(RPL11)と結合して、RPL11 を核小体につなぎとめること、すなわち PICT1 欠損によって、RPL11 が核小体から移動し、核質で MDM2 と結合して MDM2 の機能を顕著に抑制し p53 を強く活性化することを見出し、PICT1 は p53 を活性化する「核小体ストレス経路」の重要な制御因子であることを報告した(Nat Med、2011)。そこで、PICT1 と RPL11 との結合阻害剤が、p53 を活性化させるがん治療薬となる可能性が高いことから、2012 年度には大規模低分子化合物スクリーニングにむけたアッセイ系を構築した。

さらに、PICT1 欠損マウスが胎生早期に致死であったことから、T 組織や皮膚特異的な PICT1 欠損マウスの作製解析も行った。

C. PTEN の機能解析研究

多くの癌細胞には酸素の有無にかかわらず主に解糖系に依存したエネルギー

一代謝を行う現象（ワーバーグ効果）があり、この過程に PKM2 や HK2 などの酵素が重要であることがわかっている。

我々は PTEN 欠損により Akt が活性化して PPAR γ が増加し、下流の転写標的として、PKM2 や HK2 の転写が促進され、これによって細胞増殖が加速することから、PTEN による発がんやがんの進展機構に、PPAR γ を介した解糖系代謝変化が重要であることを報告した。

業績目録

原著論文

1. Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki SO, Dong Y, Tokuda M, Morikawa T, Hikasa H, Eggenschwiler J, Yabuta N, Nojima H, Nakagawa K, Hata Y, Nishina H, Mimori K, Mori M, Sasaki T, Mak TW, Nakano T, Itami S, Suzuki A
Cancer susceptibility and embryonic lethality in *Mob1a/1b* double-mutant mice
J. Clin. Invest. 122(12), 4505-18, 2012
2. Panasyuk G, Espeillac C, Chauvin C, Pradelli LA, Horie Y, Suzuki A, Annicotte JS, Faias L, Foretz M, Verdeguer F, Pontoglio M, Ferre P, Scoazec JY, Bimbaum MJ, Ricci JE, Pende M
PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver
Nat. Commun. 3, 672, 2012

総説論文

1. Suzuki A, Kogo R, Kawahara K, Sasaki M, Nishio M, Maehama T, Sasaki T, Mimori K, Mori M
A new PICTure of the nucleolar stress
CANCER SCIENCE 103(4), 632-637, 2012
2. 河原康一、西尾美希、佐々木雅人、前濱朝彦、佐々木雄彦、古後龍之介、三森功士、森 正樹、鈴木 聡
PICT1 による核小体ストレス経路を介した p53 と腫瘍進展制御～腫瘍予後マーカーや今後の創薬応用にむけて～
遺伝子 Mook22 号 最新疾患モデルと創薬応用研究の最前線 in press, 2012
3. 西尾美希、佐々木雄彦、鈴木 聡
PTEN 変異による発がんモデル
疾患モデルの作製と利用 ― がん (エル・アイ・シー社) ―145-171, 2012

- 古後龍之介、三森功士、小宗静男、鈴木 聡、森 正樹
核小体ストレス経路を介した p53 制御遺伝子 PICT1 遺伝子の機能～特に大腸癌について～
大腸癌 Frontier 5(2), 175(82)-179(89)

学会発表等

- 鈴木聡
癌抑制遺伝子シグナル研究によるヒト疾患・病態の解明と治療薬開発
上原記念生命科学財団第8回特定研究・研究集会 2012年5月30日 東京
- 鈴木聡
上皮管腔組織形成におけるMob1の役割とその破綻
新学術領域領域会議 2012年6月10日 仙台
- Miki Nishio, Koichi Hamada, Satoshi Itami, Akira Suzuki
Functions of Mob1 tumor suppressor genes in vivo The Joint symposium of the 7th International Symposium of the Institute Network
2012年6月15日 Sendai(仙台)
- 鈴木聡
遺伝子改変マウスを用いた癌抑制遺伝子研究の新展開 ～新規 p53 制御機構や Hippo 経路について～
微研がんセミナー 2012年7月26日 微研ホール
- Akira Suzuki
Functions of Mob1A/1B tumor suppressor genes in vivo
オンタリオ癌研究所セミナー 2012年8月10日 オンタリオ癌研究所・カナダ
- 西尾美希、河原康一、佐々木雅人、佐々木雄彦、前濱朝彦、三森功士、森正樹、鈴木聡
Role of PICT1 in T cell development and malignancy
PICT1 による T 細胞性腫瘍の抑制
第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日 札幌
- 丸本朋稔、廖紀元、山口沙織、岡野慎士、竹田直樹、三浦由恵、二井偉暢、坂本千香、河野紘隆、永井陽子、河原康一、鈴木聡、谷憲三郎
Suppression of Pten promotes the generation of induced pluripotent stem cells
PTEN 機能抑制による高効率人工多能性幹細胞作製法
第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日 札幌
- 鈴木聡、西尾美希、濱田浩一、河原康一、佐々木雅人、鈴木聡、日笠弘基、水野健作、佐々木雄彦、板見智
Functional analysis of tumor suppressor genes Mob1A/1B

- Mob1A/1B によるがんの発症・進展制御
第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日 札幌
9. 小林恭介、河原康一、鈴木聡、谷憲三郎、高橋淳
Characterization of FEAT function in vivo
個体における FEAT 機能の解析
第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日 札幌
10. 鈴木聡
遺伝子改変マウスを用いた癌抑制遺伝子研究の新展開 ～新規 p53 制御機構や Hippo 経路
について～
旭川医科大学病理学セミナー 2012 年 11 月 15 日 旭川医科大学
11. 西尾 美希, 濱田 浩一, 佐々木 雄彦, 板見 智, 鈴木 聡
Mob1A・Mob1B による発生・発がんの制御
日本分子生物学会ワークショップ 腫瘍抑制シグナルの新局面 2012 年 12 月 13 日 福岡
12. 日笠 弘基, 鈴木 聡
内在性 YAP/TAZ 特異的レポーター遺伝子の開発とその応用
日本分子生物学会ポスター 2012 年 12 月 13 日 福岡
13. Youyi Dong, Li Sui, Fuminori Yamaguchi, Kazuyo Kamitori, Yuko Hirata, Akira Suzuki,
Mohammad Akram Hossain, Masaaki Tokuda
PTEN regulates hair cell proliferation and differentiation of the mouse inner ear
第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡
14. 西尾美希、濱田浩一、板見智、鈴木聡
MOB1 による個体発生と腫瘍発症制御
「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2013 年 2 月 7 日 滋賀
15. 西尾美希、濱田浩一、河原康一、森川琢海、板見智、鈴木聡
MOB1 による個体発生と腫瘍発症制御～ヒト外毛根鞘癌の原因遺伝子の同定～
宮崎サイエンスキャンプ 2013 年 2 月 15 日 宮崎
16. 森川琢海、西尾美希、鈴木聡
MOB1 による肝・胆管細胞制御
宮崎サイエンスキャンプ 2013 年 2 月 16 日 宮崎

