

[033]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2018年

<https://hdl.handle.net/2324/6617896>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 33, pp.1-, 2019. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



システム免疫学統合研究センター
Research Center for Systems Immunology

情報生物学分野

Division of Bioinformatics

教授：須山 幹太

Professor : Mikita Suyama, Ph.D.

情報生物学分野では，計算機を用いたバイオインフォマティクス解析，特に，ゲノム配列やエピゲノムについてのデータの比較解析から，遺伝子の発現制御機構やその異常による疾患発症機序を解明することを目的にして研究を進めている．具体的には，がんゲノムコンソーシアムやエピゲノムコンソーシアムの進展により蓄積している生命医科学ビッグデータを積極的に活用し，がんの予後関連因子の探索や疾患関連遺伝子発現制御機構の解析を行っている．また，マイクロアレイや次世代シーケンサーといったハイスループットな技術革新に伴い，生命医科学全般においてバイオインフォマティクス解析，すなわち計算機を用いた大規模なデータ解析が必須となってきている．このような現状においては，実験生物学者と情報生物学者の連携が重要であり，そのため当研究室では積極的に共同研究を行うとともに，データ解析技術の普及にも務めている．

平成 30 年度は，須山幹太（教授），佐藤哲也（助教），齋藤大助（助教），吉原美奈子（特任助教），吉村香（テクニカルスタッフ）に加え，大学院生 4 名の体制で研究を進めた．平成 30 年 5 月に佐藤哲也が，また，平成 31 年 3 月に齋藤大助が，それぞれ退職した．

A. 腫瘍内不均一性を基にしたがんの予後解析

がんは様々な変異の蓄積により細胞増殖や細胞周期の調節に異常をきたした細胞群のことである．近年登場した次世代シーケンシング技術により，それぞれのがん細胞が持つ変異の組み合わせは，ある患者が持つがん細胞間によって異なっており（これを腫瘍内不均一性；Intratumor Heterogeneity, ITH という），非常に多様な細胞集団を形成していることが明らかとなった．ITH はがんの進行により高くなることから，患者の予後との関連が示唆されてきた．そのため，ITH を予後予測因子として用いるためのいくつかの指標が開発され，患者の予後との関連について様々な研究が行われてきた．しかしながら，これらの指標はすべてのがん種に適応できる頑健なものではない．これは，がんの種類によってその進化の特徴が異なっていることによるものであり，これまでに開発された 1 次元の指標では予後との関係を十分に表すことができていないためであると考えられる．そこで，ITH を多次的に捉えるために，各サンプルの持つ変異由来の VAF (Variant Allele Frequency) の分布を用いた解析を行った．TCGA に登録されている 16 種類のがん由来の計 6, 064 サンプルのデータを用いて解析を行った結果，7 種類のがんにおいて VAF の分布と予後との関連が見られた．予後と

関連する VAF の分布はがんの種類によって大きく異なっており、より多くの突然変異が必ずしもより悪い予後に関連するとは限らないという結果が得られた (原著論文 3, 7).

B. 乾癬の発症リスクに関与する機能多型の網羅的探索

ヒト疾患の多くは一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) などの複数の遺伝的要因の積み重ねによって引き起こされる多因子疾患である。これまで、SNPs と疾患を含む様々な形質との関連を調べる手法であるゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study; GWAS) が様々な形質に対して実施されており、多くの疾患リスク SNPs が同定されているが、報告されている SNPs はマーカーに過ぎず、実際に影響を及ぼしている機能多型の多くは未だ不明なままである。分子病態の詳細を理解するためには、機能多型を同定した上でそれぞれが遺伝子機能にどのような影響を及ぼしているのか、その作用機序を明らかにする必要がある。本研究では、代表的な多因子疾患である慢性皮膚角化疾患の乾癬を対象として、公共エピゲノム・トランスクリプトームデータの統合・再解析による機能多型の網羅的探索を行った。

本解析の結果、29 個の乾癬関連機能多型を同定した。その内、non-coding 領域に位置するものは 15 個であり、全てが未報告であった。とくに、1 番染色体に存在する多型 (rs72635708) が EGF signaling 制御因子をコードする *ERRF1* 遺伝子の遠位エンハンサー領域に存在することを発見した。このエンハンサー領域には AP-1 転写因子を構成するタンパク質の結合が認められ、rs72635708 はその認識配列に位置していたことから、この多型は AP-1 転写因子の結合レベルを変化させ転写活性を減少させる可能性が考えられた。また、DNase-seq データの allele-specific mapping の結果を参照すると、この多型はクロマチン構造を変化させることも明らかになった。以上の結果より、乾癬発症に関与する機能多型およびターゲット遺伝子の具体例を初めて示すことができた。

C. エクソン SNV データに基づく近交系ラット 25 系統の系統関係の解析

Hemiplasy とは共通祖先から由来した種間において、種の分岐過程を表した系統樹である species tree と遺伝子についての系統樹である gene tree が一致しない現象である。この現象は、次世代シーケンサーから得られるデータによってゲノムレベルでの系統解析が可能になってから新たに生じた課題であるといえる。この現象を考慮した系統関係の解析がこれまでウシ科、鳥類、マウスなどではすでに行われているが、ラットでの報告はない。ラットは古くからヒト疾患モデル動物として広く利用されており、詳細な系統解析は亜系統間の免疫反応実験などにおいて非常に重要である。そこで本研究では、hemiplasy の原因になる可能性がある変異パターンを” discordant

site”と定義して、近交系ラット 25 系統のエクソン SNV データを用いて discordant site の探索を行った。Discordant site は、亜系統に存在する多型が他の系統でも見られる部位を示す。また、亜系統間にわたって共通した discordant site を含む遺伝子についてエンリッチメント解析を行った。その結果、discordant site はラットのゲノム全体に広く認められた。特に、免疫系及び嗅覚受容体遺伝子で多く見られた。この結果は、これらのローカスでは祖先型多型 (ancestral polymorphism) が存在していたこと、すなわち各系統へ分化する時点でハプロタイプが多いローカスが存在しており、系統分化の後に系統特異的なハプロタイプがランダムに残ったことを示していると解釈できる。今後は、ラットのゲノムデータを用いて hemiplasy を考慮した系統解析を行い、近交系ラット間の系統関係及びゲノム進化過程を明らかにすることを目指している。

D. 個人ゲノムデータ及びトランスクリプトームデータを用いた pseudo-exon activation の網羅的探索

遺伝性疾患の主な原因として、アミノ酸をコードしているエクソン領域に変異が入ることが知られている。しかし、最近、エクソン領域の変異だけでなく、アミノ酸をコードしていないイントロン領域で、スプライス部位に全く関係のない、より深い領域に変異が入ることが疾患の原因となっていることが相次いで報告されている。これは、変異により新たなスプライス部位が形成され、本来イントロンの一部であった領域がエクソンとして転写産物に取り込まれることで異常な mRNA を形成することによるものである。このような現象は pseudo-exon activation と呼ばれている。そこで、この現象がどの程度の割合で見られるものであるかを明らかにすることを目的とした解析を行った。方法として、個人ゲノムデータ及びトランスクリプトームデータを用いて、このようなイントロン変異による pseudo-exon activation を網羅的に探索することが可能な解析パイプラインを構築した。このパイプラインでは、個人の SNP 情報を反映させたリファレンスゲノムを構築することで、その個人のトランスクリプトームデータを精度よくマッピングするようにした。このパイプラインを 1000 人ゲノムプロジェクトより得られたデータの内、末梢血由来の質の高いトランスクリプトームデータを持った 246 人分のデータに適用した。その結果、今まで疾患の原因として散発的に報告されていた pseudo-exon activation という現象が、疾患の有無に拘わらず普遍的に見られるものであることを明らかにした。個人あたり、平均で約 3 ヶ所の pseudo-exon activation が存在した。この結果は、疾患原因変異の探索においてイントロンの深い位置で pseudo-exon activation が起きている可能性を考慮することの重要性を示すものである。

業績目録

原著論文

1. Kita Y, Katayama Y, Shiraishi T, Oka T, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Miyata K, Oike Y, Shirane M, Nishiyama M, Nakayama KI. 2018.
The Autism-Related Protein CHD8 Cooperates with C/EBP β to Regulate Adipogenesis.
Cell Rep. 23, 1988-2000.
2. Baba T, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon JY, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi MH, Ohkawa Y, Morohashi KI. 2018.
Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids.
Commun Biol. 1, 18.
3. Kikutake C, Yoshihara M, Sato T, Saito D, Suyama M. 2018.
Intratumor heterogeneity of HMCN1 mutant alleles associated with poor prognosis in patients with breast cancer.
Oncotarget. 9, 33337-33347.
4. Katoh-Fukui Y, Baba T, Sato T, Otake H, Nagakui-Noguchi Y, Shindo M, Suyama M, Ohkawa Y, Tsumura H, Morohashi KI, Fukami M. 2018.
Mouse polycomb group gene Cbx2 promotes osteoblastic but suppresses adipogenic differentiation in postnatal long bones.
Bone. 120, 219-231.
5. Kikuchi M, Nishimura T, Saito D, Shigenobu S, Takada R, Gutierrez-Triana JA, Cerdán JLM, Takada S, Wittbrodt J, Suyama M, Tanaka M. 2018.
Novel components of germline sex determination acting downstream of foxl3 in medaka.
Dev Biol. 445, 80-89.
6. Shima Y, Miyabayashi K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Doi M, Okamura H, Suzuki K. 2018.
Fetal Leydig cells dedifferentiate and serve as adult Leydig stem cells.
Development. 145, dev169136.
7. Kikutake C, Yoshihara M, Sato T, Saito D, Suyama M. 2018.
Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity associated with patient prognosis using multidimensional measures.
Oncotarget. 9, 37689-37699.

著書

1. 須山幹太. 2018.
ゲノム解析.
よくわかるバイオインフォマティクス入門 (藤博幸編), 第6章, pp.83-96.
講談社, 東京.

学会発表

1. Mikita Suyama (2018, 5/30).
Exploring molecular basis of phenotype-genotype links using chromosome conformation data.
The 7th Meeting on Grant-in-aid for Scientific Research on Innovative Areas “Chromosome Orchestration System”, Stockholm, Sweden.
2. Chie Kikutake, Minako Yoshihara, Tetsuya Sato, Daisuke Saito, Mikita Suyama (2018, 8/15).
Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity associated with prognosis of patients.
Cold Spring Harbor Conference “2018 Mechanisms & Models of Cancer”, New York, USA.
3. Chie Kikutake, Minako Yoshihara, Tetsuya Sato, Daisuke Saito, Mikita Suyama (2018, 10/18).
Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity associated with patient prognosis using multidimensional measures.
The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine and the 28th Hot Spring Harbor Symposium “Biomedical Sciences in the Era of Big Data”, Fukuoka, Japan.
4. Naoto Kubota, Tetsuya Sato, Mikita Suyama (2018, 10/19).
Understanding gene regulation using chromosome conformation and epigenomic data.
The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine and the 28th Hot Spring Harbor Symposium “Biomedical Sciences in the Era of Big Data”, Fukuoka, Japan.
5. 菊竹智恵, 須山幹太 (2018, 9/28).
腫瘍内不均一性が予後に及ぼす影響
第77回日本癌学会学術総会, 大阪.
6. 久保田直人, 須山幹太 (2018, 11/28).
ERRFI1 遺伝子のエンハンサークラスターに存在する一塩基多型と乾癬の発症リスク
第41回日本分子生物学会年会, 横浜.
7. 金賢正, 吉原美奈子, 須山幹太 (2018, 11/29).
ゲノムデータに基づく近交系ラット25系統の系統関係の解析
第41回日本分子生物学会年会, 横浜.
8. 井上実紀, 馬場崇, 齋藤大助, 大川恭行, 須山幹太, 諸橋憲一郎 (2018, 11/29).

一細胞トランスクリプトーム解析による胎仔型ライディッシュ前駆細胞の探索

第41回日本分子生物学会年会, 横浜.

9. 坂口愛美, 須山幹太 (2018, 11/30).

個人ゲノムデータ及びトランスクリプトームデータを用いたエクソン活性化の網羅的探索

第41回日本分子生物学会年会, 横浜.

10. 菊竹智恵, 須山幹太 (2018, 11/30).

多次元の指標を用いた腫瘍内不均一性と予後との関連解析

第41回日本分子生物学会年会, 横浜.

11. Mikita Suyama (2019, 1/28).

Understanding gene regulation using chromosome conformation and epigenome data.

The 8th Meeting on Grant-in-aid for Scientific Research on Innovative Areas “Chromosome Orchestration System”, Yamagata, Japan.

12. Daisuke Saito, Tetsuya Sato, Hidehiro Toh, Hiroaki Okae, Takahiro Arima, Hiroyuki Sasaki, Mikita Suyama (2019, 2/3).

Cluster analysis of chromatin state profiles in differentiating human trophoblast cells.

International Symposium on Epigenome 2019, Tokyo, Japan.

粘膜防御学分野

Division of Mucosal Immunology

教授：澤 新一郎

Professor : Shinichiro Sawa, M.D., Ph.D.

当分野は、平成 31 年 1 月 1 日に新設された分野である。澤新一郎のほか、助教 1 名、博士課程学生 1 名、共同研究員 5 名、技術補佐員 1 名、事務補佐員 1 名の計 10 名が研究に参加した。

粘膜組織は生体防御の最前線であり、感染症やアレルギーなど免疫が関与する種々の疾患の主座になりうる。当分野では、粘膜組織に局在する 3 型自然リンパ球(ILC3)や機能的間葉系細胞に注目し、宿主免疫系と共生微生物との双方向性活性化機構や平衡維持を担う原理原則の解明、免疫組織形成機構の解明を目指している。現在はマウス遺伝学と網羅的遺伝子発現解析を技術的な両輪とし、粘膜関連リンパ組織における細胞—細胞間ネットワークや腸管細胞—微生物間ネットワークの解明を進めている。これらの基礎的な研究が炎症性腸疾患や食物アレルギーなど、ヒトの粘膜組織を主座とする様々な疾患の病態解明へとつながると想定している。

平成 30 年度は科研費の挑戦的研究(萌芽)、基盤研究 B、日本医療研究開発機構 AMED 委託事業などの補助金による支援をうけた。さらに、ILC3 の生体内機能解明を目的とし、3 月よりアステラス製薬株式会社との共同研究が開始された。

A. 3 型自然リンパ球による腸管粘膜制御機構の解明

a. 3 型自然リンパ球特異的欠損マウスモデルの作出

自然リンパ球(Innate Lymphoid Cell=ILC)は T 細胞や B 細胞、NK 細胞とも起源を異にし、抗原受容体を有さないリンパ球群の総称である。このうち 3 型自然リンパ球(ILC3)は我々が 2008 年に発見し、腸管リンパ組織形成や腸管粘膜バリア機能の維持に極めて重要な役割を果たすことを報告した (Satoh-Takayama et al., *Immunity*, 2008; Sawa et al, *Science*, 2010)。ILC3 のうち、ckit^{high} CCR6 陽性分画はパイエル板や Cryptopatch などのリンパ組織に局在し、LTi-like 細胞と呼ばれている。しかし、腸管における LTi-like 細胞の役割は完全には明らかになっていない。我々は ILC3 特異的にジフテリア毒素受容体(DTR)を発現するマウスモデル(ILC3-iDTR マウス)の作出に成功し、ジフテリア毒素投与後の腸管 ILC3 分画の数的変化を詳細に解析した。その結果、ジフテリア毒素 1 回投与による LTi-like 細胞除去作用は極めて高く、数ヶ月単位で減少状態が維持されていた。今年度、LTi-like 細胞が特異的に欠失するマウスとして ILC3-iDTR マウスを国立大学法人北海道大学より特許出願した(特願 2017-016832, PCT/JP2019/003185)。

b. 腸管における 3 型自然リンパ球機能の解明

ジフテリア毒素を腹腔内に 1 回投与した ILC3-idTR マウスでは LTi-like 細胞のみならずパイエル板や腸間膜リンパ節における T 細胞や B 細胞数も激減した。パイエル板のリンパ濾胞の構造が崩壊していた。また、新生仔期より LTi-like 細胞を継続的に除去し続けたマウスでは離乳後に腸炎が自然発症した。これらの結果は、LTi-like 細胞は成体リンパ組織の維持に極めて重要な役割を果たしていること、LTi-like 細胞が腸管バリア機能の維持に中心的役割を担う ILC3 であることを強く示唆する内容である（現在論文投稿準備中）。

B. RANKL 陽性間葉系細胞による免疫組織形成機構の解明

免疫系に重篤な欠損がある個体は新生児期の生体防御機構が働かず、生き延びることができない。特に粘膜組織は出生時に微生物が侵入する経路となるため、腸管上皮や粘膜関連リンパ組織 (Gut-Associated Lymphoid Tissue=GALT) は個体の生死を分ける重要な免疫防御網として機能する。そこで、本分野では腸管免疫を担うパイエル板や腸管膜リンパ節、全血球系細胞の起源である骨髄が形成されるメカニズムを間葉系細胞に注目して解明する。

a. リンパ節形成機構の解明；リンパ節オーガナイザー細胞の同定

TNF ファミリーサイトカインの一種である RANKL はリンパ節形成に必須の分子であることが 1990 年代後半から知られていたが、リンパ節形成における RANKL の役割や産生細胞については不明な点が多かった。これまで我々はリンパ管内皮への RANKL 刺激がリンパ節形成に必須であることを証明している (Onder et al., Immunity, 2017)。今年度は、RANKL レポーターマウスや細胞系列特異的な RANKL 欠損マウスを用いた実験から、胎児期に RANKL を発現する間葉系細胞がリンパ節形成に必須の細胞であることを明らかにした。これまで、LTi 細胞と呼ばれるリンパ球とオーガナイザー細胞と呼ばれる間葉系細胞の双方向性活性化がリンパ節形成に重要であると提唱されてきたが、オーガナイザー細胞の実態は明らかでなく、リンパ節形成現象を時空間的に紐解くことは不可能であった。本研究結果は RANKL 陽性間葉系細胞こそが真のオーガナイザー細胞であることを世界に先駆けて提唱する貴重な内容である（現在論文投稿準備中）。

b. パイエル板成熟機構の解明；MCi 細胞の時期特異的標識・追跡系の確立

パイエル板などの粘膜関連リンパ組織には上皮細胞の一種である Microfold 細胞 (M 細胞) が存在し、管腔側から抗原を直接取り込む。我々はこれまで M 細胞分化に必須の間葉系細胞 (M cell inducer=MCi 細胞) の同定に成功し、MCi 細胞に発現する膜型サ

イトカイン RANKL の重要性を明らかにしてきた (Nagashima et al., Nat Immunology, 2017). M 細胞を欠損するパイエル板では B 細胞濾胞が低形成であり, 腸内細菌特異的 IgA 産生が低下し, 腸内細菌叢の構成が変容する. 一方, M 細胞は無菌マウスにも存在するため, MCi 細胞の出現は腸内細菌非依存的で遺伝的にプログラムされた現象と考えられた (Nagashima et al., Biochem Biophys Res Commun., 2017). しかし, MCi 細胞が個体発生の中の時期に出現し, M 細胞分化誘導を開始するか明らかでなかった. 本年度は時期特異的な RANKL 発現細胞の標識・追跡が可能な RANKL-tTA;LC1; tdTomato マウスの作出に成功し, MCi 細胞が出生直後から 1 週間以内に出現することを明らかにした. 新生児早期における MCi 細胞出現は腸内細菌の選択的定着や免疫系の成熟過程におけるターニングポイントと考えられるため, 今後は MCi 細胞の起源や再生プロセスを解明してゆきたい.

c. 骨髓腔形成機構の解明 ; Fetal Osteoclast inducer 細胞の同定

野生型マウスの骨髓は出生時に形成され, 造血を開始している. 一方, RANKL を先天的に欠損するマウスは骨髓腔が狭小化し, 骨髓外の組織で造血が行われる. 新生児期以降の微生物生着に備え, 粘膜バリア機能を維持するためには, 骨髓造血を正常に行い, 免疫細胞を粘膜組織に恒常的に供給する必要がある. マウスの大腿骨では胎生 15 日ごろから破骨細胞の作用による肥大軟骨の吸収と空洞形成が開始し, 血管内皮と間葉系細胞から構成される骨髓が腔内に形成される. しかし, どのような分子メカニズムで胎児期の骨髓が形成されるか明らかになっていない. 我々は胎生 15 日の RANKL レポーターマウスの大腿骨を組織学的に観察し, 骨中央部に RANKL 陽性細胞が集積することを見出した. これらの RANKL 発現細胞を特異的に欠損させると破骨細胞分化誘導と骨髓腔形成が障害され, 新生児期の骨髓が低形成になることが明らかになった. 我々はこれらの RANKL 発現細胞を fetal Osteoclast inducer (f0ci)細胞と命名し, マウス骨髓形成に不可欠な間葉系細胞として提唱しはじめた (論文投稿準備中).

業績目録

総説

1. 澤 新一郎. 2018.
自然リンパ球と疾患
炎症と免疫 (先端医学社) 2018; 26(4):73-79.

学会発表

1. Sawa S., Sumiya E. and Nagashima K. (2018, 5/31 - 6/1).
Intestinal homeostasis maintained by subepithelial mesenchymal cell.
第 22 回腸内細菌学会, 東京. (国際シンポジウム招待講演・口頭発表)
2. 澤 新一郎. (2018, 5/31 - 6/1).
リンパ節オーガナイザー細胞の同定
第 28 回 KTCC, 京都 (一般演題・口頭発表)
3. 澤 新一郎. (2018, 7/4).
3 型自然リンパ球は本当に腸管バリア機能の維持に重要か?
第 3 回 ソニー ライフサイエンス学術セミナー, 東京. (特別講演・口頭発表)
4. 澤 新一郎. (2018, 7/5).
腸管免疫の基盤, 3 型自然リンパ球
第 8 回 オルソオルガノジェネシス研究会, 札幌. (特別講演・口頭発表)
5. 澤 新一郎. (2018, 7/11).
腸管免疫のゲートキーパー, 3 型自然リンパ球
第 39 回 日本炎症・再生医学会, 東京 (シンポジウム・口頭発表)
6. Sumimya E., Nakano K., Okamura T. and Sawa S. (2018, 7/27).
Fetal osteoclast inducer cells play a role in bone marrow cavity development.
第 36 回日本骨代謝学会学術集会, 長崎. (一般演題・ポスター発表)
7. 澤 新一郎. (2018, 7/27).
自然リンパ球と疾患
第 1 回北海道移植免疫研究会, 札幌. (特別講演・口頭発表)
8. Sawa S., Sumiya E., Nakano K., Okamura T. (2018, 11/29 - 12/1).
RANKL⁺ mesenchymal cell is the genuine lymphoid tissue organizer cell in the developing lymph-node.
3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells (ILC2018), 東京. (国際シンポジウム・ポスター発表)
9. Sawa S., Nakano K., Okamura T., Sumiya E. (2018, 12/12 - 12/14).
Fundamental role of LTi-like cell in the maintenance of adult intestinal homeostasis.
第 47 回日本免疫学会学術集会, 福岡. (一般演題・口頭発表)
10. Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa. (2018, 12/12 - 12/14).
The role of fetal osteoclast inducer cells in perinatal bone marrow development.
第 47 回日本免疫学会学術集会, 福岡. (一般演題・口頭発表)

防御分子構築学分野

Division of Molecular Design

I. 客員教授：谷 憲三郎 Professor : Kenzaburo Tani, M.D., Ph.D.

当分野では、血液・腫瘍性疾患患者を対象に臨床ならびに基礎研究を行っている。具体的には、新規治療法開発を目的に、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いる。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。これらの研究成果を九州大学病院におけるトランスレーショナルリサーチとして臨床への早期展開を図る計画である。

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

癌に対する治療は手術療法，化学療法，放射線療法が主だが治療抵抗例や再発例に対しては有効な治療法はなく，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。従って新しい治療法を開発することが強く望まれ，免疫細胞療法およびウイルス療法はその有力な候補の一つである。

a. 標準治療不応進行がんの患者を対象にしたクリニカルシーケンスの検討

クリニカルシーケンスとは疾患部位で起きている遺伝子変化を次世代シーケンサーを用いて解析し，遺伝子変異などの得られた結果を最新の臨床エビデンスと照らし合わせ，有用となる情報を診療に還元することである。現在，東京大学医科学研究所では標準治療不応進行がん患者を対象にクリニカルシーケンスを用いた治療を臨床試験として実施している。その1症例を報告する。標準治療不応セザリー症候群の患者(Stage II B)からがん組織と正常組織を採取し各々のDNA, RNAを抽出してWhole exome sequencing や RNA sequencing を行った。スーパーコンピューターにてバイオインフォマティクス/データ解析を行い，解析結果から actionable mutation やその標的薬物を選定するために研究者・医師による情報収集・検討を行うと同時に人工知能 IBM Watson (Watson)でも検討した。

Watson は膨大なデータの処理能力が圧倒的に高く 10 分以内で情報処理が可能であった。人キュレーションでは1週間ほどの処理時間を要したものの Watson が選択しなかったエビデンスレベルの一番高い NF κ B pathway を標的とする薬剤 lenalidomide を選択した。倫理委員会で承認後に lenalidomide の投与を開始した。1サイクル後部分寛解を認め 5 サイクル後寛解となった。本症例においては難治性進行がんに対してク

リニカルシークエンスが非常に有用であった。Watson が候補に挙げなかった NF κ B pathway の活性化は Gene Set Enrichment 解析で得た情報で、Watson には情報収集されていなかったために人キュレーションと相違が出たものと考えられた。

b. 臨床応用を目指した新規腫瘍溶解性ウイルス療法の開発

我々は新規ウイルス療法の開発を目的に、ピコルナウイルス科・エンテロウイルス属に着目して、これまでに 38 種類のウイルスを各種ヒト癌細胞株及び正常細胞に *in vitro* で感染させ、これらの細胞傷害効果について比較検討した。その結果、コクサッキーウイルス B 群 3 型 (CVB3) が正常肺線維芽細胞を傷害することなく、複数の肺癌細胞を特異的に溶解することを発見し、担ヒト肺癌ヌードマウスを用いた *in vivo* 研究において原発及び転移巣で抗腫瘍効果を誘導することを報告した。また、近年ウイルス療法の抗腫瘍効果誘導機構として、ウイルス感染による腫瘍の直接的破壊後に続く抗腫瘍免疫応答が重要因子であることが明らかになってきている。我々は、腫瘍溶解性ウイルスで初めて CVB3 が抗腫瘍免疫誘導能を有すること、すなわち HMGB1 の細胞質放出及び Calreticulin 細胞膜移行を見出した。

更に、CVB3 の欠点である正常膵臓・筋肉細胞への感染制御を目的に、各組織に特異的に発現する miRNA の相補配列搭載 CVB3-HP を作製した。また、臨床応用を念頭に置いたウイルス製造法を開発し、CVB3-HP を用いたサル及びマウスにおける非臨床毒性試験を実施した。その結果、いずれの用量においても致死量には至らなかったが、一部高用量投与群において予想外臓器における炎症所見並びに生化学的異常所見が認められたことを受け、さらに遺伝子改変を行い安全性を飛躍的に向上させた CVB3-BHP の作製に成功した。本ウイルスは正常細胞全般に対しても殺傷能力が著しく低下するよう設計されており、先行する CVB3-HP において認められた予想外の高用量投与群での臓器障害の発生を回避できるものと考えている。実際に、マウスの高用量投与毒性試験において CVB3-HP は生化学異常所見を示したにもかかわらず、改良された CVB3-BHP は正常値を示した。現在では CVB3-BHP の臨床応用に向けて、開発した製造法にてウイルス製剤を作製し、非臨床試験の完了を目指している。

c. 固形腫瘍に対する新規ポリマーコートスティルス腫瘍溶解麻疹ウイルス療法の開発

我々はこれまでに新規麻疹ウイルス療法開発を目的に遺伝子組み換え麻疹ウイルス (MV-NPL) を開発し、そのヒト腎癌に対する *in vitro* およびマウス *in vivo* での抗腫瘍効果を報告してきた。一方で現在のウイルス療法の問題点は抗体産生のため複数回接種ができず治療効果の維持が必ずしもできにくい点がある。この問題を解決する目的で我々はコンドロイチン硫酸ポリマーを用いた新たな技術での MV-NPL のスティル

ス化を検討した。その結果、ポリマーコート MV-NPL の腫瘍親和性と、中和抗体からの回避能を明らかにできた。さらに本ウイルス製剤の大量培養・精製法を確立し、サルでの安全性試験を行った。本新規ポリマーコートウイルスは新たなウイルス療法として今後の臨床展開が可能と考えられた。

d. 5-アミノレブリン酸 (ALA) を用いた末梢血循環がん細胞の検出

がん患者の血中に存在することが報告されている循環がん細胞 (CTC) の解析は、診断のみならず、治療方法の選択や治療予後のモニタリングに有用であると考えられ、各種の検出、解析方法の開発が進められている。これまでに報告されている方法としては、がん細胞の表面マーカーやフィルター、マイクロ流路を用いて CTC を濃縮回収する方法が主である。特に固形腫瘍の解析では、がん細胞表面に発現する EpCAM を利用して CTC を回収する方法が知られているが、血中に存在する CTC では固形腫瘍で発現する EpCAM の発現が低いとの報告があり、EpCAM を利用するだけでは CTC を部分的にしか検出できない可能性が考えられる。従って EpCAM の発現が低い CTC も検出できる新たな検出方法を開発することで、より多様な CTC 分画が検出可能になると考えられる。

我々は、アミノ酸の一種であり動植物の生体内に含まれている 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いて、その細胞内代謝産物であるプロトポルフィリン IX ががん細胞内に特異的に蓄積する性質を利用し、CTC を高感度に検出する新規 CTC 解析方法を開発している。この方法では、EpCAM(-) の CTC も検出できる事が期待でき、再発を含むがんの早期検出、早期治療開始が可能となるため治療予後改善に繋がる事が期待できる。

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の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か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. 血液・免疫系難病患者由来 iPS 細胞を用いた新規薬剤の開発

九州大学小児科、東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング科、及び和歌山県立医科大学血液内科より提供頂いた患者由来末梢血もしくは骨髄から、センダイウイルスベクターを用いて患者由来 iPS (induced pluripotent stem) 細胞を樹立した。各 iPS 細胞は *in vitro* での 3 胚葉分化能を有し、また NANOG, Oct3/4 といった未分化マーカーを発現していた。

iPS 細胞が樹立された疾患について疾患責任遺伝子の変異が細胞機能、細胞分化、あるいは生存に与える影響を理解することを目指して、iPS 細胞より分化誘導した血液

系細胞を用いた *in vitro* 病態モデルを確立し、シーケンス解析による各疾患 iPS 細胞の原因遺伝子の確認、網羅的解析（マイクロアレイ解析）および iPS 細胞ならびに iPS 細胞由来分化細胞の機能解析を行った。また、血液細胞へ分化させて病態を細胞レベルで再現するモデルを確立し、新規薬剤候補を得る目的でそのモデルを利用した創薬スクリーニングを実施中である。

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

ヒト iPS 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。我々は複数遺伝子を搭載し、同時発現可能な非伝播型麻疹ウイルスベクターを開発し、ヒト胚性幹細胞（ES 細胞）に似たヒト iPS 細胞と基底状態 iPS 様細胞を樹立した。麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属の一本鎖 RNA ウイルスであり、野生株は signal lymphocyte activation molecule (SLAM) を介して活性化 T 細胞、B 細胞、単球系細胞に、また Nectin 4 を介して上皮系細胞に極めて高い感染力を示す。またワクチン株の Edmonston 株は広域な細胞に発現している CD46 を介して感染する。我々は野生株のウイルス RNA ゲノムを分節化し、F 蛋白質を欠損させ、H 蛋白質、M 蛋白質に変異を挿入することにより、広域な細胞に導入可能な非伝播型多遺伝子搭載可能な新規ウイルスベクターを開発した。本麻疹ウイルスベクターに 5 遺伝子（GFP, OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC）を搭載し、ヒト線維芽細胞および IL-2 存在下 CD3 刺激 T 細胞、または非刺激 T 細胞より iPS 細胞を誘導した。樹立した iPS 細胞はヒト ES 細胞様の形態を示し、NANOG 等の未分化マーカーの発現が確認できた。また、染色体の変異も認められず、*in vitro*, *in vivo* の両方において三胚葉系への分化能が確認できた。また、この麻疹ウイルスベクターを用いて臍帯血由来細胞から基底状態 iPS 様細胞を樹立することができた。この細胞は 2i（GSK3 β と MEK の阻害剤）とヒト LIF 存在下で、マウス ES 細胞に似たドーム型コロニーを形成し、NANOG や Tra-1-60 が発現していた。また単細胞解離にて ROCK inhibitor を用いずに維持することが可能であり、培養条件を変えることによりヒト ES 細胞様コロニーへと誘導することができた。さらなる解析が必要ではあるが、我々の麻疹ウイルスベクターは基底状態 iPS 細胞に似た性質の iPS 細胞へとリプログラミングすることが可能であった。

業績目録

原著論文

1. Tahara M., Takishima Y., Miyamoto S., Nakatsu Y., Someya K., Sato M., Tani K., Takeda M. 2019 (in press).
Photocontrollable mononegaviruses.
Proc Natl Acad Sci USA.
2. Kohara H., Utsugisawa T., Sakamoto C., Hirose L., Ogawa Y., Ogura H., Sugawara A., Aoki T., Iwasaki T., Takayoshi Asai T., Doisaki S., Okuno Y., Muramatsu H., Abe T., Kurita R., Miyamoto S., Sakuma T., Shiba M., Yamamoto T., Ohga S., Yoshida K., Ogawa S., Ito E., Kojima S., Kanno H., Tani K. 2019 (in press).
KLF1 Mutation E325K induces cell-cycle arrest in erythroid cells differentiated from congenital dyserythropoietic anemia (CDA) patient-specific induced pluripotent stem cells.
Exp Hematol.
3. Verma S., Yeddula N., Soda Y., Zhu Q., Pao G., Moresco J., Diedrich JK., Hong A., Plouffe S., Moroishi T., Guan KL., Verma IM. 2019 (in press).
BRCA1/BARD1 dependent ubiquitination of NF2 regulates Hippo-YAP1 signaling.
Proc Natl Acad Sci USA.
4. Oshima Y., Takahashi S., Tani K., Tojo A. 2019 (in press).
Granulocyte colony-stimulating factor-associated aortitis in the Japanese adverse drug event report database.
Cytokine.
5. Jia Y., Miyamoto S., Soda Y., Takishima Y., Sagara M., Liao J., Hirose-Yotsuya L., Hijikata Y., Miura Y., Hara K., Iwanaga A., Ota Y., Tani K. 2019.
Extremely low organ toxicity and strong antitumor activity of miR-34-regulated oncolytic coxsackievirus B3.
Mol Ther Oncolytics. 12: 246-258.
6. Hamada K., Takagi S., Kuboshima H., Shimada H., Takagi K., Yasuoka T., Matsubara K., Sassa Y., Furuya T., Suzuki K., Uchide T., Mizutani T., Tani K., Itoh H., Sugiyama T. 2018.
Cloning of carrier cells infected with oncolytic adenovirus driven by midkine promoter and biosafety studies.
J Gene Med. e3064.
7. Li Y, Kobayashi K, Murayama K, Kawahara K, Shima Y, Suzuki A, Tani K, Takahashi A. 2018.
FEAT enhances INSL3 expression in testicular Leydig cells.
Genes Cells. 23(11):952-962.

8. Wang B., Ogata H., Takishima Y., Miyamoto S., Inoue H., Kuroda M., Yamada K., Hijikata Y., Murahashi M., Shimizu H., Okazaki T., Nakanishi Y., Tani K. 2018.
A novel combination therapy for human oxaliplatin-resistant colorectal cancer using oxaliplatin and coxsackievirus A11.
Anticancer Res. 38(11):6121-6126.
9. Hijikata Y, Okazaki T, Tanaka Y, Murahashi M, Yamada Y, Yamada K, Takahashi A, Inoue H, Kishimoto J, Nakanishi Y, Oda Y, Nakamura Y, Tani K. 2018.
A phase I clinical trial of RNF43 peptide-related immune cell therapy combined with low-dose cyclophosphamide in patients with advanced solid tumors.
Plos One. 13(1):e0187878.
10. Iwata M., Hirose L., Kohara H., Liao J., Sawada R., Akiyoshi S., Tani K., Yamanishi Y. 2018.
Pathway-Based Drug Repositioning for Cancers: Computational Prediction and Experimental Validation.
J Med Chem. 61(21):9583-9595.
11. Kawai A, Goto T, Shibata T, Tani K, Mizutani S, Nishikawa A, Shibata T, Matsumoto S, Nagata K, Narukawa M, Matsui S, Ando M, Toguchida J, Monden M, Heike T, Kimura S, Ueda R. 2018.
Current state of therapeutic development for rare cancers in Japan, and proposals for improvement.
Cancer Sci. 109(5):1731-1737.
12. Shitaoka K, Hamana H, Kishi H, Hayakawa Y, Kobayashi E, Sukegawa K, Piao X, Lyu F, Nagata T, Sugiyama D, Nishikawa H, Tanemura A, Katayama I, Murahashi M, Takamatsu Y, Tani K, Ozawa T, Muraguchi A. 2018.
Identification of Tumoricidal TCRs from Tumor-Infiltrating Lymphocytes by Single-Cell Analysis.
Cancer Immunol Res. 6(4):378-388.

総説

1. 谷憲三朗（東京大学生命科学教科書編集委員会）. 2019.
現代生命科学 第2版.
羊土社.

学会発表

国際学会

1. Jia Y, Miyamoto S, Hirose L, Sagara M, Takishima Y, Shimizu H, Tani K. (2018, 5/16 - 5/19).
Novel microRNA engineered oncolytic virotherapy for clinical trial.
ASGCT 21st Annual Meeting, USA.

2. Liao J, Kohara H, Hiramoto T, Tahara M, Sugawara A, Miura Y, Hirose L, Takishima Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K. (2018, 5/16 - 5/19).
Evaluation of Non-Integrating RNA Measles Virus Vectors for Reprogramming of Human Hematopoietic Subsets.
ASGCT 21st Annual Meeting, USA.
3. Hirose L, Kohara H, Miura Y, Hijikata Y, Soda Y, Miyamoto S, Liao J, Takahashi S, Shinozaki M, Ota Y, Watanabe E, Tanaka T, Nakajima M, Kiniwa S, Okuyama R, Fukuhara H, Inoue K, Namikawa T, Hanasaki K, Tani K. (2018, 10/27).
Pilot study to detect circulating tumor cells in human peripheral blood using 5-aminolevulinic acid.
6th International ALA and Porphyrin Symposium, Shizuoka.
4. Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Tahara M, Takishima Y, Hirose L, Hijikata Y, Miyamoto S, Takeda M, Tani K. (2018, 12/1 - 12/4).
Efficient Gene Transduction and Reprogramming of Hematopoietic Cells Including T-Cells By Using a Non-Integrating Measles Virus Vector.
60th ASH Annual Meeting and Exposition, USA.

国内学会

1. 廣瀬理沙, 小原洋志, 宮本将平, 土方康基, 高橋聡, 篠崎大, 田中徹, 中島元夫, 木庭幸子, 奥山隆平, 福原秀雄, 井上啓史, 並川努, 花崎和弘, 谷憲三朗. (2018, 4/14 - 4/15).
5-ALA を用いた末梢血循環がん細胞の検出法確立にむけたパイロット研究.
第 8 回ポルフィリン-ALA 学会年会, 東京.
2. Hirose L, Kohara H, Utsugisawa T, Ogura H, Sugawara A, Ogawa Y, Sakamoto C, Kanno H, Tani K. (2018, 5/24 - 5/26).
Dysregulated cell-cycle by KLF1 mutation induces cell-cycle arrest in erythroid cells derived from CDA- iPSCs.
第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会, 栃木.
3. Sagara M, Miyamoto S, Hara K, Miura Y, Hirose L, Takishima Y, Jia Y, Soda Y, Hijikata Y, Iwanaga A, Shimizu H, Tani K. (2018, 7/26 - 7/28).
Large scale production of novel recombinant coxsackievirus B3 towards human clinical trial.
第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 東京.
4. Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Kohara H, Hirose L, Takishima Y, Hijikata Y, Miyamoto S, Tahara M, Takeda M, Tani K. (2018, 7/26 - 7/28).
Non-integrating measles virus vector is an outstanding gene transfer tool for establishing iPSCs from human T cells and hematopoietic progenitor cells.
第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 東京.

5. Jia Y, Miyamoto S, Hirose L, Sagara M, Takishima Y, Shimizu H, Tani K. (2018, 7/26 - 7/28).
Novel microRNA engineered coxsackievirus B3 for oncolytic virotherapy.
第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 東京.
6. Jia Y, Miyamoto S, Hirose L, Sagara M, Takishima Y, Shimizu H, Tani K. (2018, 9/27 - 9/29).
Novel safe and effective oncolytic virotherapy by miRNA-regulation.
第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪.
7. Sagara M, Miyamoto S, Hara K, Miura Y, Hirose L, Takishima Y, Jia Y, Soda Y, Hijikata Y, Iwanaga A, Shimizu H, Tani K. (2018, 9/27 - 9/29).
The investigation of a recombinant coxsackievirus B3 manufacturing process for human clinical trial.
第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪.
8. Liao J, Soda Y, Sugawara A, Miura Y, Hiramoto T, Takishima Y, Hijikata Y, Miyamoto S, Tahara M, Takeda M, Tani K. (2018, 9/22).
Successful establishment of iPSCs from hematopoietic cells with a non-integrating measles virus vector.
第 10 回血液疾患免疫療法学会学術集会, 東京.
9. Hirose L, Kohara H, Miyamoto S, Hijikata Y, Takahashi S, Shinozaki M, Ota Y, Watanabe E, Tanaka T, Nakajima M, Kiniwa S, Okuyama R, Fukuhara H, Inoue K, Namikawa T, Hanasaki K, Tani K. (2018, 10/12 - 10/14).
Pilot study to detect circulating tumor cells in human peripheral blood using 5-aminolevulinic acid.
第 80 回日本血液学会学術集会, 大阪.
10. 廣瀬理沙, 小原洋志, 三浦由恵, 土方康基, 曾田泰, 宮本将平, 廖紀元, 高橋聡, 篠崎大, 大田泰徳, 渡辺恵理, 田中徹, 中島元夫, 木庭幸子, 奥山隆平, 福原秀雄, 井上啓史, 並川努, 花崎和弘, 谷憲三朗. (2018, 12/22).
5-ALA を用いた末梢血循環がん細胞の検出法確立にむけたパイロット研究.
第 5 回先端 PDDT フォーラム, 奈良.

シンポジウム

1. Miyamoto S, Sagara M, Jia Y, Hara K, Iwanaga A, Shimizu H, Tani K. (2018, 7/26 - 7/28).
The current preparative status of oncolytic coxsackievirotherapy toward clinical trial.
第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 東京.

II. 客員准教授：揚妻 正和 Associate Professor : Masakazu Ageetsuma, Ph.D.

当部門では、「光学技術（光神経活動イメージング，光遺伝学など）」を開発・応用することで，情動を司る脳内情報処理様式の解明，そしてそこから精神疾患治療への新たな応用法の提案を目指している．本年度は情動記憶に関わる *in vivo* 神経活動イメージング，およびそれにより得られたデータの解析を中心に展開した．加えて，それら観察により検知された特徴的な変化の因果性を検証するために，光遺伝学をベースにした新たな光学系の構築を進めている．また，発光イメージングを基軸とした研究も共同研究として進めている．

A. 情動記憶に関する *in vivo* 神経活動イメージングと光遺伝学的活動操作

マウスの「内側前頭前野（mPFC）」はヒトの前頭前野背外側部に相当すると言われ，報酬記憶・嫌悪記憶といった様々な情動に関する記憶の管理を担う．

大脳皮質での情報処理においては，神経細胞集団は全体として精密に制御されなければならないことがこれまでに示唆されている．一方，実際どのような制御が脳機能の達成に重要であるかについては，情報論的な概念や仮説が提唱されるにとどまっている場合が多い．当部門ではこれまで，2光子神経活動イメージング技術によりこの問題に着手し，さらに光遺伝学的な神経活動操作を同時に行う手法を確立することで，大脳皮質での神経集団による情報コーディング（population coding）の基盤について明らかにしてきた（Ageetsuma et al., Cerebral Cortex, 2018）．現在はこれらの技術を応用し，擬似自由行動中のマウスにおける神経集団活動の経時的な計測と操作を行うことで，神経細胞集団による情動記憶の情報処理基解明を目指している．

観察対象部位としては，恐怖記憶との関連が指摘され，トップダウン的に恐怖反応を引き起こすと考えられている mPFC に着目している．多数の神経細胞からの活動記録を実現するために，2光子神経活動イメージングを行った．すでに導入されているオリンパス社の多光子励起レーザー走査型顕微鏡 FVMPE-RS を利用し，レゾナントスキャナにより～200Hz の速度での観察を実現した．

過去の研究で，mPFC の一部，前辺縁皮質（PL）では，学習依存的な恐怖反応に伴って，神経活動の上昇が報告されている．すなわち，音と電気ショックの組み合わせで恐怖条件付けを行った場合，条件刺激である音に対しての神経活動は，学習の成立に伴い増加する（Sotres-Bayon and Quirk, Curr. Opin. Neurobiol., 2010）．一方，本能的なすくみ行動には関係がないことが知られており，学習依存的に PL での情報処理様式が変化し，そしてその「出力結果」として恐怖反応を引き起こしていると考えられる．それを受け，深部イメージングを行うための光学系・実験手法を確立し，PL を中心とした mPFC からの神経活動観察を進めた．遺伝子コード型カルシウムセンサーの利用により，長期的に細胞を標識し，同一の神経細胞群における学習経過を通じた神

経発火パターンの変化についてのデータ取得を進めた。

さらにそこから、イメージングデータの解析による記憶コードに関する特徴抽出を進めている。これまでのところ、単一神経細胞レベル、及び神経細胞群としての両方のレベルにおいて、学習の前後では単に活動が上昇するというもののみならず、様々な活動変化が起こることを見出した。

今後は解析をさらに進めるのみならず、光遺伝学的手法を利用することで、それらの特徴の人工的な活性化および抑制を行い、その因果性を検証していく。光遺伝学的手法と SLM 技術などを組み合わせることで、任意の神経活動パターンを作ることが可能となる (Packer et al., 2014)。この目的のための光学系は現在構築中であり、今後はその他の手法も交えながら、解析から見出した要素の重要性を直接的に検証していく計画である。

B. 発光イメージングによる自由行動中のマウスからの活動観察

電位プローブは、細胞の膜電位変化を直接可視化できるため、パッチクランプ法等の従来の電気生理学的手法では困難であった、1) subcellular レベルの細胞内電位変化の観察や、2) 脳や心臓など多細胞組織における領域ごとの膜電位変化の詳細な計測、など新たな観察を可能としている。

これまで、蛍光色素やタンパク質を用いた様々な電位プローブが発表されてきている。膜電位感受性色素は、非常に明るい上、反応速度が速く、大脳皮質等におけるマクロな電氣的活動計測に利用されてきた。しかし、神経細胞もグリア細胞も非特異的に染色し、また染色の度合いをコントロールするのが難しいなどの理由で、観察対象の特定や再現性に問題があった。そこで細胞種特異的な発現制御の可能なタンパク質プローブの開発が現在盛んに行われており、膜電位感受性ホスファターゼの膜電位感受性ドメインや、古細菌型ロドプシンを基にした高性能なプローブがいくつも報告されてきている。近年は特に古細菌型ロドプシンを利用したプローブの性能向上が著しく、長所である優れた反応速度を維持しながらも、欠点であった *in vivo* における SN 比の低さも克服しつつある。

これら蛍光型膜電位プローブの発展型として、当部門では大阪大学・永井研究室との共同研究として「生物発光」を用いたプローブの開発に取り組んできた。生物発光（発光機序より、以下化学発光という）イメージングでは、蛍光イメージングで問題になる背景光による影響がないため、特に動物個体や組織標本など厚みのある標本で高い画像コントラストが得られる。近年、我々は、化学発光タンパク質を利用することで、世界初となる化学発光膜電位指示タンパク質 (LOTUS-V) の開発に成功した (Inagaki et al., 2017)。LOTUS-V により、励起光照射なしで神経細胞の活動電位が検出可能であり、なおかつ比率測定型のプローブなため、観察対象の「動き」にも強い。

これを用いた実験により、自由行動中のマウス第一次視覚野 (V1) 神経細胞において、

フィールド電位を高感度に計測することが出来た（論文査読中）。さらに、蛍光プローブにより自由行動中の動物で計測を行う際、複数のマウスを同じケージ内におくと、蛍光の励起・検出用に頭部に繋げているファイバーが絡まることが問題となる。しかし、LOTUS-Vを用いた計測ではそのためのファイバーが必要ないため、これらの利点を利用することで、複数マウスにおける同時計測が実現した。

この計測法によって、マウスが互いに接触する際に、V1の活動が優位に上昇することを新たに発見している（査読中）。今後は、社会性行動を制御する脳機能などの新たな発見へとつながること期待される。

業績目録

原著論文

1. Agetsuma M., Hamm JP, Tao K., Fujisawa S., Yuste R. 2018.
Parvalbumin-Positive Interneurons Regulate Neuronal Ensembles in Visual Cortex.
Cerebral Cortex 28, 1831-1845.

総説

1. 稲垣成矩, 揚妻正和, 永井健治. 2018.
蛍光タンパク質 「vi. 脳活動測定のための膜電位プローブ」
実験医学 Vol.36 No.20 p3510-3512.
2. 揚妻正和, 鍋倉淳一. 2018.
光が拓く神経科学の未来 - オプトジェネティクスと光イメージング 「大脳皮質のシナプス再編」
Clinical Neuroscience 36 巻 8 号 p959-962.

学会・国際会議での発表(口頭)

1. Masakazu Agetsuma, Yoshiyuki Arai, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto, and Takeharu Nagai. (2018, 7/27).
Population coding of fear memory in medial prefrontal cortex
Neuroscience2018, Kobe Convention Center, Japan.
2. Masakazu Agetsuma. (2018, 10/4).
Two photon brain activity imaging to uncover in vivo prefrontal computation underlying fear memory
NIPS-CIN symposium, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Tübingen, Germany.

3. 揚妻 正和. (2019, 3/2).
不安・恐怖関連神経回路における脳内情報処理基盤を「光」で読み解く（招待講演）
第11回日本不安症学会学術大会，岐阜じゅうろくプラザ.
4. Masakazu Agetsuma, Yoshiyuki Arai, Atsushi Kasai, Hitoshi Hashimoto, and Takeharu Nagai.
(2019, 3/30).
Optical neuroscience: reading and manipulating neural computation behind cognition, memory,
and behavior (chair としてシンポジウム開催)
(口頭発表演題：Population coding of fear memory in prefrontal cortex)
Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS 2019), Kobe Convention Center,
Japan.

防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

客員教授：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。当分野では分子生物学、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破綻病態の解明、およびがん関連遺伝子を標的とする治療薬開発」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がんのみならず、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、最近注目されつつある Hippo 経路、がん抑制遺伝子の代表格である p53 や PTEN の機能やその制御機構を解析し、これら遺伝子を標的とする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。

(ちなみに神戸大学における人事異動としては、2018年4月から修士課程大学院生として田村宗太氏、秦奈緒子氏、小園眞喜氏が入学し、長部葉子氏が技術補佐員に加わった。一方、修士課程大学院生の青野ゆかり氏が卒業し就職した。)

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。液性因子起因性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。特に隣の細胞との接触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、またがん抑制シグナルとして 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、幹細胞維持、細胞遊走、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、ストレス刺激、柔軟な細胞外マトリックス時などに、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Hippo経路各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、この経路が発生に必須であること、外毛根鞘がんや混合性肝がんの原因遺伝子経路の一部はHippo経路であること、がん以外に軟骨異形成症の原因となりうること、MOB1はこれらHippo経路のハブとして作動し、内因性YAPを最も強力に制御できることを報告するとともに、YAP/TAZ活性を抑制可能な天然物も提示してきた。

2018年度には、主にHippo経路の細胞競合に対する役割について解析した。

細胞競合現象は、哺乳類では個体発生、腫瘍排除や腫瘍進展時などに関与する。これまでNIH3T3細胞ではYAPの標的転写因子TEADの過剰発現によって細胞競合の勝者となること、MDCK細胞ではYAPの過剰発現によって細胞競合の敗者となり単層培養から排除されることが報告されていた。これらの先行研究から細胞競合現象におけるYAPの役割はcontext-dependentであることが類推される。我々は皮膚細胞株を用いた活性化YAP1の過剰発現は、通常培養では細胞競合敗者となることを確認した。これは、YAP1過剰発現細胞はfibronectinや17型コラーゲンをはじめとするいくつかの細胞接着因子の発現低下をみ、細胞-細胞外基質間接着が低下して、細胞接着起因性の細胞増殖能が低下することによると考えられた。一方YAP過剰発現による細胞接着非依存性の細胞増殖能はむしろ亢進した。それ故、YAP過剰発現細胞は、細胞接着が起きにくい培養条件では勝者となった。*In vivo*では、MOB1が欠損した（内因性のYAP1を活性化した）皮膚細胞では、17型コラーゲンなどの発現が低下し、これら皮膚移植片を野生型レシピエントへ移植すると、周りの正常細胞に押されて、移植片が基底膜から排除された。これらのことからYAPの活性化は細胞競合を制御する一因子であり、これは細胞接着を減弱させることが一因であることを示した。今後皮膚片の生着効率上昇にはYAPを過剰に活性化させないことが重要であると予想される。

一方、YAPを標的とする薬剤開発では、YAP蛋白質量を低下させる新規低分子化合物を2種見出すとともに、YAP蛋白質低下は示さないもののYAPによる転写活性を低下させるヒット化合物をも見出した。

B. PTENの機能解析研究

我々はこれまでにがん抑制遺伝子PTEN欠損が引き起こす種々のがんや種々のがん以外の疾患の発症に関与することを明らかにしてきた。

PTENの異常は遺伝子変異よりも蛋白質量や酵素活性低下による事が多い。またPTEN

蛋白質量を軽度上昇させたトランスジェニックマウスでは個体寿命も顕著に延長する。そこでPTENの分解に関わる既存ユビキチンリガーゼ5種のうち、最も強力なものはWWP2であったため、現在PTENとWWP2の直接結合を阻害する低分子化合物スクリーニングのためのTR-FRET系を樹立した。

一方PTEN-EGFP発現細胞に、Crisper/Cas9システムでバーコードを含むsgRNAライブラリーを作用させ、PTENの発現が高くなった細胞をソート後導入されたsgRNAをバーコードを頼りに次世代シーケンスで解析して、PTENを不安定化する新規分子のスクリーニングを終え、この標的分子に対する異なるsgRNAでもPTENを安定化することを確認して、その序列もつけた（生医研 須山幹太先生との共同研究）。

C. P53を制御する核小体ストレス経路の機能解析研究

p53の安定化機構は、DNAストレス(DNA障害)や発がんストレス(Rasなどがん遺伝子活性化)による機構が主に解析されてきたが、近年これらに加えて、核小体ストレスによる機構が脚光をあびている。核小体ストレス時には、核小体に存在する一部のリボソーム蛋白質(RPL11など)が核質へ移行し、核質のMDM2と結合することによりMDM2の機能を低下させp53が安定化する。

我々は、PICT1の作用を初めて同定、命名し、(ア)この分子がRPL11を核小体に繫留する核小体蛋白質であること、(イ)核小体ストレス下ではPICT1が速やかに崩壊消失することで、RPL11が核小体から核質へ局在変化し、これによって核小体ストレス経路が活性化されて細胞死を導くこと、(ウ)PICT1が発現低下した、p53に変異のない癌患者は、著しく予後良好であること等を報告した。これらのことから、PICT1とRPL11の結合阻害剤は、新しい作用機序のp53安定化薬剤として、p53変異のないがんに対する抗腫瘍薬になる可能性がある。

そこでPICT1とRPL11の結合可視化系を、TR-FRET法で構築し、これを用いてこれら2分子の結合を阻害し、p53を活性化させる低分子化合物を見出したが、IC50濃度が高いため今後この化合物の構造類縁体を解析する。

また、質量分析解析で同定したPICT1と結合する蛋白質49種類の中から、PICT1と直接結合してPICT1の蛋白質安定化に関わる新規分子も見出し、これらがrRNAやPICT1と結合し、p53の安定化制御に関わる分子であることを見出した。

業績目録

原著論文

1. Nishio M, Miyachi Y, Otani J, Tane S, Omori H, Ueda F, Togashi H, Sasaki T, Mak TW, Nakao K, Fujita Y, Nishina H, Maehama T, Suzuki A. 2019.
Hippo pathway controls cell adhesion and context-dependent cell competition to influence skin engraftment efficiency.
FASEB J. 2019 Jan 14:fj201802005R. doi: 10.1096/fj.201802005R.
2. Li Y, Kobayashi K, Murayama K, Kawahara K, Shima Y, Suzuki A, Tani K, Takahashi A. 2018.
FEAT enhances INSL3 expression in testicular Leydig cells.
Genes Cells 23(11):952-962.

学会発表等

1. 西尾美希, 大森裕文, 藤 庸子, 中谷圭佑, 青野ゆかり, 清野 透, 益田宗幸, 中川尚志, 片渕秀隆, 田代浩徳, 前濱朝彦, 鈴木 聡. (2018, 4/13).
Hippo 経路による子宮頸がんの発症進展制御
第 55 回日本臨床分子医学会学術集会, 京都. (ポスター)
2. 宮地洋佑, 前濱朝彦, 西尾美希, 鈴木 聡. (2018, 5/26).
がん制御因子 PICT1 の安定化機構
第 65 回日本生化学会近畿支部例会, 兵庫県西宮市. (口演)
3. 鈴木 聡. (2018, 6/14 - 6/15).
Hippo シグナル経路による細胞競合機構とその破綻病態
第 6 回新学術領域「細胞競合」班会議, 神戸. (口演)
4. 西尾美希, 宮地洋佑, 大森裕文, 上田史仁, 大谷淳二, 前濱朝彦, 藤田恭之, 仁科博史, 鈴木聡. (2018, 6/14 - 6/15).
Hippo シグナル経路による細胞増殖変化と細胞間コミュニケーション
第 6 回新学術領域「細胞競合」班会議, 神戸. (ポスター)
5. 前濱朝彦, 福本未記, 北山翔太, 西尾美希, 鈴木 聡. (2018, 6/29).
PTEN 制御の分子機構解析
第 17 回生命科学研究会, 東京. (口演)
6. 西尾美希, 大森裕文, 藤 庸子, 前濱朝彦, 田代浩徳, 鈴木 聡 (シンポジウムオーガナイザー兼任). (2018, 9/24 - 9/26).
Hippo キナーゼ経路による生体制御
第 91 回日本生化学会大会 シンポジウム「リン酸化一脱リン酸化応答とがん」, 京都.
7. 福本未記, 前濱朝彦, 北山翔太, 西尾美希, 鈴木 聡. (2018, 9/24 - 9/26).

- HECT 型 E3 リガーゼ WWP2 による PTEN 制御の分子機構解析
第 91 回日本生化学会大会, 京都. (ポスター)
8. 青野ゆかり, 西尾美希, 藤庸子, 前濱朝彦, 清野 透, 片渕秀隆, 田代浩徳, 鈴木 聡. (2018, 9/24 - 9/26).
子宮におけるがん抑制遺伝子 MOB1 の機能解析
第 91 回日本生化学会大会, 京都. (ポスター)
9. Akira Suzuki (シンポジウム座長兼任), Miki Nishio, Hirofumi Omori, Yoko To, Tomohiko Maehama, Yukari Aono, Tohru Kiyono, Kenichi Taguchi, Muneyuki Masuda, Shinya Toyokuni,, Hironori Tashiro, Hidetaka Katabuchi. (2018, 9/27 - 9/29).
Critical role of Hippo signaling pathway at the onset of squamous cell carcinomas.
The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Symposium S12 Animal models in cancer research, Osaka.
10. 大森裕文, 西尾美希, 佐藤晋彰, 田口健一, 下野洋平, 三森功士, 益田宗幸, 鈴木 聡. (2018, 9/27 - 9/29).
MOB1-YAP1 は頭頸部扁平上皮癌発症の強力なドライバー経路である
日本癌学会総会, 大阪. (ポスター)
11. 渋谷尚樹, 下野洋平, 南博信, 掛地吉弘, 鈴木 聡. (2018, 9/27 - 9/29).
ヒト乳がん異種移植モデルの微小転移がん幹細胞で発現低下しているマイクロ RNA-25 の解析
日本癌学会総会, 大阪. (ポスター)
12. Hirofumi Omori, Hiroshi Nishina, Akira Suzuki. (2018, 11/2 - 11/6).
MOB1-YAP1 is the most potent oncogenic driver pathway for the onset of head and neck squamous cell carcinoma.
Annual International Hippo Symposium, Xiamen, China. (ポスター)
13. 鈴木 聡, 前濱朝彦. (2018, 11/13).
癌抑制遺伝子を標的とする癌治療法の開発
AMED 次世代がん医療創生研究事業 平成 30 年度ステージゲート評価 (研究領域 A) ヒアリング審査会, 東京.
14. 西尾美希 (ワークショップ座長兼任), 大森裕文, 藤庸子, 中谷圭佑, 青野ゆかり, 清野透, 益田宗幸, 中川尚志, 片渕秀隆, 田代浩徳, 前濱朝彦, 鈴木 聡. (2018, 11/30).
Hippo 経路分子 Mob1 変異による肝がん発症機構
第 41 回日本分子生物学会年会ワークショップ (MBSJ2018), 横浜.
15. 日笠弘基, 乾 雅子, 平良眞規, 鈴木 聡, 上野 光. (2018, 11/30).
Hippo 経路エフェクター YAP/TAZ を制御する因子の同定
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜. (ポスター)

16. 鈴木 聡, 西尾美希, 大森裕文, 前濱朝彦. (2019, 1/30 - 1/31).
Hippo 経路の破綻による最速自然発癌モデルマウスの作製
平成 30 年度文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成成果発表会, 大津. (口演)
17. 宮地洋佑, 前濱朝彦, 西尾美希, 鈴木 聡. (2019, 1/31 - 2/1).
がん制御因子 PICT1 の安定化機構
第一回 神戸大学 シグナル伝達医学研究展開センター「若手道場」, 淡路島. (口演)