
疾患モデル動物の開発と解析：

難治性ヒト疾患の病態解明と診断・治療への応用

平成24年度～平成28年度「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

研究成果報告書

平成 29 年 5 月

学校法人名： 関西医科大学

大学名： 関西医科大学

研究組織名： 大学院医学研究科

研究代表者： 木梨達雄

目 次

はじめに	1.
疾患モデル動物センター概要	2.
I. 研究プロジェクト概要	2.
II. 研究成果の概要	7.
III. 原著論文リスト	21.
IV. 疾患モデル動物	34.
資料：研究プロジェクト各事業推進者研究成果報告書概要集	57.

はじめに

近年ヒトゲノムプロジェクトの進展によって難治性疾患や生活習慣病の関連遺伝子が次々と明らかにされ、原因解明から治療や予防法の確立に研究を進展させることが急務となっている。これらの疾患は環境要因を含めた多因子の相互作用によって起こる高次生命現象であり、試験管内だけの解析では不十分であることは明白である。本学は21世紀COEプログラム骨髄移植の研究から「場の再生・修復」研究を大学の特色ある研究として推進してきた。この研究過程から高次生命現象の破綻と修復・再生研究に適合した疾患モデル動物が作出され、*in vivo* イメージングなどの解析技術等の開発などにより優れた成果を挙げることができた。そこで遺伝子改変動物等を用いた個体レベルでの解析を掘り下げるとともに、ヒト疾患への応用展開を促進させるため、「疾患モデル動物センター」を設立の必要性が生じた。平成25年度本学学舎移転によって研究拠点が枚方地区に移動する。そこで疾患モデル動物を用いた研究拠点を形成する。拠点形成によって分子レベルの解析から疾患モデル動物の樹立、*in vivo* 解析を充実させ、難治性疾患の解明から治療につなげる領域横断的研究と次世代医学研究者の育成を推進することを目的とした。

本拠点形成は、医学の特定分野を限定せず、造血・免疫、癌、神経、老化、代謝に関連する難治性疾患のモデル動物の樹立、病態解析と予防治療を目標とする。21世紀COEプログラムから得られた成果を進展させ、細胞外マトリックス、造血幹細胞、組織幹細胞、癌細胞、細胞接着因子、それらを制御する細胞内因子などに異常をきたすモデル動物を作出し、各組織・臓器の場の調節とその破綻を解析し、新知見に基づく新規治療法の開発までを領域横断的に行う。研究対象は、造血幹細胞、間葉系幹細胞、免疫系細胞、消化器系、循環器・呼吸器系、神経系、皮膚組織等であり、これらの細胞外環境と細胞の増殖・分化、機能、細胞動態に関するものである。手法として、遺伝子改変による疾患モデル動物、細胞、組織のイメージング技術、幹細胞の同定・解析技術、移植技術、蛋白質相互作用、シグナル伝達解析などを活用する。

5年間の拠点形成活動および学長主導の連携促進施策によって様々な分野の情報交換や共同研究が促進され、若手研究者の研究マインド育成に役立ち、細胞外マトリックス、感染・免疫、造血、神経、癌の分野で独自性の高い研究が育成された。すでに創薬に向けて臨床的応用が進行している分野、萌芽的であるが有望な成果もあり、今後の発展が期待される。5年間で作出された疾患モデルの成果はデータベースとして公開し、学内外との連携促進を図るとともに、疾患モデル動物センターを拠点として独自性の高い本学研究を展開させていきたい。

I. 研究プロジェクト概要

1. **大学名:** 関西医科大学
2. **プロジェクト所在地:** 大阪府枚方市新町二丁目5番1号
3. **研究プロジェクト名:** 疾患モデル動物の開発と解析：
難治性ヒト疾患病態解明と診断・治療への応用
4. **研究代表者:** 木梨達雄（医学研究科・教授）
5. **プロジェクト参加研究者数** 156 名
6. **研究組織名:** 大学院医学研究科

先端共通技術部門、病態解析部門、治療予防部門の3つの部門体制からなる。研究代表者は研究プロジェクト全体の統括と推進をおこなう。先端共通技術部門では凍結胚・精子、遺伝子改変操作を行い、各部門の研究と連携する。病態解析部門は当該研究分野のヒト疾患モデル動物・病態モデル作出・解析を行う。治療予防部門は病態モデルによる治療戦略を検討する。各部門は講座主任教授あるいは准教授が代表となり、大学院生（45名）、PD（1名）を指導し、研究を推進する。遺伝子改変マウス、樹立された疾患モデル動物、病態解析技術、治療開発について関連各講座間の共同研究を推進する。すでにヒト化マウス、免疫疾患モデル、癌病態モデルなど共同研究が進行している。

研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
木梨 達雄	医学研究科・教授	免疫細胞動態制御による免疫疾患モデルマウス開発と免疫疾患解析	(病態解析部門) 免疫病モデル疾患動物の樹立と解析
岡崎 和一	医学研究科・教授	IgG4 関連疾患・自己免疫性消化器疾患・自己免疫性消化器疾患動物モデル開発と診断治療	(病態解析部門) 消化器疾患モデル動物による治療開発
藪田 精昭	医学研究科・教授	組織造血幹細胞制御による難治性血液疾患の	(治療予防部門) 造血疾患モデル動

		治療開発	物による治療開発
中邨 智之	医学研究科・教授	弾性線維再生機構の破綻による難治性疾患モデル開発	(病態解析部門) 老化疾患モデル動物の開発と解析
上野 博夫	医学研究科・教授	マルチカラー細胞系譜追跡マウスの開発による組織幹細胞とそのがん化の解析	(病態解析部門) in vivo 解析手法の樹立と解析
李 成一	医学研究科・准教授	遺伝子改変疾患モデル動物の開発	(先端共通技術部門) 遺伝子改変技術による病態モデル創出
松田 達志	医学研究科・准教授	自然免疫シグナル破綻によるモデル疾患動物の開発と解析	(病態解析部門) 免疫病モデル疾患動物の樹立と解析
伊藤 量基	医学研究科・准教授	免疫原性血小板減少症のモデルマウス開発とその病態解明	(病態解析部門) 免疫病モデル疾患動物の樹立と解析
藤澤 順一	医学研究科・教授	HTLV-1感染ヒト化マウスモデルを用いた ATL 発症予防法の開発	(治療予防部門) ヒト化マウスを用いた治療予防
伊藤 誠二	医学研究科・教授	未知機能分子の遺伝子改変マウスの作製と動物モデルによる機能解析	(病態解析部門) 難治性神経疾患の病態解析
日下 博文	医学研究科・教授	剖検組織およびモデルマウスを用いた筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の研究	(病態解析部門) 難治性神経疾患の病態解析
杉本 哲夫	医学研究科・教授	薬剤選択法による iPS 細胞由来神経幹細胞の単離	(病態解析部門) 難治性神経疾患の病態解析
飯田 寛和	医学研究科・教授	骨髄移植を用いた SKG/Jc1 マウスの関節破壊ならびに骨粗鬆症の解明	(治療予防部門) 骨軟部組織疾患の治療開発
楠本 健司	医学研究科・教授	難治性ヒト疾患モデル動物を用いた組織欠損に対する修復、再生、再建の実験的研究	(治療予防部門) 骨軟部組織疾患の治療開発
岡本 祐之	医学研究科・教授	SCF トランスジェニックマウスを用いた紫外	(病態解析部門) 皮膚疾患の治療開

		線皮膚傷害に対する表皮メラノサイトの役割	発
高橋 寛二	医学研究科・教授	眼疾患モデルによる病態解明と新規治療法の開発	(治療予防部門) 眼疾患の治療開発
螺良 愛郎	医学研究科・教授	アラキドン酸欠乏時に生体が産生するミード酸の乳癌細胞に対する影響	(病態解析部門) 癌治療予防の開発
西山 利正	医学研究科・教授	疾患モデル動物における再生医療の応用と高度不飽和脂肪酸の生活習慣病予防と治療	(病態解析部門) 生活習慣病予防
中谷 壽男	医学研究科・教授	脊髄損傷に対する細胞治療の実験的研究	(治療予防部門) 神経損傷の治療開発
友田 幸一	医学研究科・教授	難治性気道炎症性疾患における好酸球の機能的役割の検討	難治性気道炎症の解析と治療開発
小早川 令子	医学研究科・教授	先天的恐怖と後天的恐怖の情報統合メカニズム	高次神経機能解析と疾患モデル開発
平野 伸二	医学研究科・教授	自閉症におけるプロトカドヘリンの役割	高次神経機能解析と疾患モデル開発
中村 加枝	医学研究科・教授	脳内神経伝達物質の破綻による疾患モデルの作成と評価	高次神経機能解析と疾患モデル開発

<研究者の変更状況)>

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
脊髄損傷に対する細胞治療の実験的研究	医学研究科・教授	中谷 壽男	(治療予防部門) 神経損傷の治療開発

(変更の時期：平成 26 年 3 月 31 日) 退職のため

7. 研究施設・設備・装備

「疾患モデル動物センター」の設立:、SPF 環境を満たすセンターを設立し、疾患モデル動物の作製・管理・維持を行う。施設面積 1358.11 平方米、参加全講座の動物飼育を行っている。

施設名称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費(千円)	補助金額(千円)	補助主体
疾患モデル動物センター	24	1,358 m ²	31	98	500,941	248,014	私学助成

1. オートクレーブ 3 台、飼育関連器材等の洗浄機 1 台：モデル動物（マウス・ラット用）の管理・維持のために、週 5 日ケージ、ラック等を滅菌消毒し、搬入による汚染を防止している。
2. 胚操作システム：顕微鏡下に受精卵などの胚を操作し、遺伝子の導入及び胚性幹細胞等の単離・導入の等を行うことによって遺伝改変操作によるモデル疾患動物を作製するために導入し、平均 3 日/週程度で稼働している。

研究設備の名称	整備年度	型番	台数	稼働時間数	事業経費(千円)	補助金額(千円)	補助主体
オートクレーブ	24	VSSRZ-R18W (両扉)	2	週 6 日	64,398	42,932	私学助成
オートクレーブ	24	VSSRZ-R12W	1	週 6 日			
ケージウォッシャー (洗浄機)	24	TY-2400DW	1	週 3 日	15,668	10,000	私学助成
胚操作システム	24	ECRIPSE T1-U 電動 AMC セット	1	週 3 日	17,474	11,649	私学助成

研究費（千円）

	平成 24 年度	平成 25 年度	平成 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	合計
消 耗 費	34,747	37,764	43,683	35,417	56,102	207,713
光 熱 費	0	4,507	5,391	4,474	8,501	22,873
通信 運搬費	121	76	724	78	150	1,149
印刷 製本費	51	0	100	263	86	500
旅費交通 費	566	916	1,600	279	1,031	4,392
賃借料	0	0	0	0	756	756
報酬・ 委託料	8,878	10,945	9,491	16,494	23,712	69,520
会合費	109	56	0	219	254	638
支払 手数料	0	50	35	56	186	327
雑費	318	478	1130	244	1,186	3,356
修繕費	78	412	0	304	507	1,301
人件費	0	1,038	620	9,090	14,427	25,175
教育研究 用機器備 品	17,665	8,951	1,467	7,788	3,745	39,616
図 書	29	17	350	101	63	560
合計	62,562	65,210	64,591	74,807	110,706	377,876

II. 研究成果の概要

細胞外マトリックス破綻による疾患モデル（薬理学）：

組織の伸縮性を担うのは弾性線維という細胞外マトリックスであり、その劣化・分解が皮膚のたるみだけでなく肺気腫や動脈中膜硬化の直接原因となる。本研究では新たな細胞外マトリックス分子の遺伝子改変マウス作成による新規疾患モデルを開発し、生体内での役割を明らかにする。LTBP-4 という細胞外マトリックスタンパク質の遺伝子欠損マウスの解析を行い、弾性線維形成不全のため肺気腫や動脈の硬化と蛇行などヒト老化に類似した表現型を示すこと、我々が以前作成したFibulin-5の遺伝子欠損マウスによく似ていることを見いだした。LTBP-4がFibulin-5と結合しFibulin-5-エラスチン複合体をマイクロフィブリル上に沈着させるための足場となることを明らかにした(*4)。LTBP-2という細胞外マトリックスタンパク質の遺伝子変異が複数の先天性緑内障患者で報告された。これらの患者は眼圧が上昇し水晶体脱臼を伴うのが特徴で、眼圧上昇の程度は症例によって大きく異なっている。我々は*Ltbp2*遺伝子欠損マウスの作成と解析を行い、眼圧は上昇しないが水晶体脱臼はおこること、その原因が水晶体を支持する毛様小帯の形成不全によること、LTBP-2は毛様小帯のマイクロフィブリル線維束を形成するために必須の役割を持つことを明らかにした。またLTBP2変異患者でみられる眼圧上昇は二次的なものであることが示唆された(*3)。二重欠損マウスは重度の肺気腫を発症し、約半数の二重欠損マウスが生後1ヶ月以内に死亡した。また、LTBP-2欠損マウスの毛様小体にLTBP-4を強制発現させたところ、LTBP-2欠損マウスに見られた水晶体脱臼の表現型が改善され、毛様小帯形成が回復した。これらの結果からLTBP-2とLTBP-4は共に成熟したマイクロフィブリル線維束の形成に必要であることが証明された(*1)。これらの研究から眼科との連携が促進された。

接着破綻による自己免疫疾患モデル（分子遺伝学部門）：

Rap1下流エフェクター分子Mst1の欠損マウスは加齢とともに自己免疫様病態を呈する。本プロジェクトではそのメカニズムとRap1シグナル制御を明らかにすることを目的とする。Mst1キナーゼ欠損マウスは多臓器に炎症細胞浸潤および自己抗体産生が起これ、この病態はT細胞系列で欠損した場合で起こることから胸腺選択過程を解析した結果、胸腺細胞の選択異常が見出された。2光子顕微鏡を用いた胸腺組織イメージングの手法を樹立し解析した結果、胸腺髄質に存在する成熟胸腺細胞の移動の低下し、さらに負の選択過程を再現した胸腺組織イメージング手法を確立し解析した結果、Aire陽性胸腺上皮細胞との抗原依存的接着（免疫シナプス）が負の選択過程で起こ

っており、Mst1 欠損で障害されていることが明らかになった (*12)。また、胸腺細胞の移動や免疫シナプス形成には Rap1 シグナルが必要であり、Semaphorin3e/PlexinD1 を介して負に制御されていることを明らかにした (*6)。自己免疫病態を抑制する制御性 T 細胞 (Treg) の機能を解析した結果、Mst1 欠損 Treg は抑制機能が障害されていることがマウス腸炎モデルを用いて明らかになった。さらに Mst1 欠損 Treg は抗原特異的抑制機能が低下しており、樹状細胞との免疫シナプス形成が低下していることが判明した (*11)。一方、Mst1 欠損細胞障害性 T 細胞 (CTL) の障害機能は亢進していた。Mst1 は FoxO1/3 を抑制することによって T-bet を介する IFN γ , granzyme の産生を抑制していた (*7)。ヒト自己免疫疾患 IgG4 関連疾患患者において健常人および関節リウマチ患者と比較して Mst1 遺伝子プロモーターのメチル化が亢進し、Treg における Mst1 発現が有意に低下していたことを岡崎、野村らと共同で報告した (*8)。以上のことから Mst1 欠損マウスモデルが呈する自己免疫病態は胸腺選択の異常、制御性 T 細胞の抑制機能低下、細胞障害性 T 細胞の機能亢進が関与していることが示され、さらに Mst1 のエピジェネティック制御異常がヒト IgG4 関連疾患に関与する可能性が指摘された。制御性 T 細胞、CTL、及びエピジェネティック解析は岡崎 (第三内) らとの共同研究で行われた。二光子生体組織イメージングによってリンパ球はリンパ組織内で LFA-1/ICAM-1 依存性の高速な移動と非依存性の低速移動をしていること、前者はケモカインによる Rap1 シグナルおよび樹状細胞が関与し、後者は間葉系細胞が産生する autotaxin/LPA による Rho シグナルが関与していることを明らかにした (*10, 9)。また免疫シナプスでは Rap1/RAPL/Mst1 カスケードによって活性化された NDR1 キナーゼがインテグリン結合蛋白質 Kindlin-3 を調節することによって高親和性 LFA-1 結合を誘導すること、そして高親和性結合が免疫シナプス形成、抗原依存的増殖に不可欠の働きをしていることを一分子イメージング、組織ライブイメージング等を用いて明らかにした (*5)。生体組織イメージングの確立により、藤澤、岡崎らと共同でヒト化マウスを用いた HTLV 感染、炎症性腸疾患解析を行う共同研究を立ち上げ、私学振興共済事業団による学術研究助成に採択され、新たな疾患モデル作成の成果を出しつつある。

IgG4 関連疾患・自己免疫性消化器疾患・自己免疫性消化器疾患動物モデル開発と診断治療 (内科学第三) :

本研究ではわが国より発信された難治性疾患である IgG4 関連疾患の瘳病変である自己免疫性瘳炎の発症機序を明らかにすることを目的とした。疾患関連抗原に特異的な自己免疫性瘳炎モデルマウスや poly I:C 免疫瘳炎モデルマウスを開発作成し、免疫・分子生物学的解析を行った。更にステロイドや免疫抑制剤以外に瘳炎発症時の小胞体ストレスとその軽減による瘳炎治療

効果について検討し、新規治療法の開発を行った。その結果、poly:IC を MRL マウスに投与して、TLR 3 を賦活して、膵炎、胆管炎、唾液腺炎などの発症を認め、自然免疫系の異常反応が自己免疫性膵炎発症に関わる可能性が示唆された。膵炎モデルマウスに $\text{elf-2}\alpha$ 脱リン酸化阻害薬投与により膵組織でのリン酸化 $\text{elf-2}\alpha$ 発現の増強と関連して膵炎の軽減が認められた (*18, 15)

2. 自己免疫性消化器疾患動物モデル開発と解析：本研究では大腸癌発生母地として問題となる潰瘍性大腸炎の動物モデルを用いて、発症機序を解析するとともに、新規治療法の開発を行うことを目的とした。ヒトの炎症性腸疾患発癌モデルと考えられる、大腸癌モデルマウスを作成し、我々の開発した消化管幹細胞マーカーであるリンカー部スレオニンリン酸化 Smad2, 3 蛋白 (pSmad2/3L-Thr) に対する抗体を用いて、腫瘍幹細胞としての可能性や発癌メカニズムについて解析した。更に実験的大腸炎モデルを用いて小胞体ストレスとその軽減による腸炎治療効果について検討し、新規治療法の開発を行った。その結果、大腸癌モデルマウスにおいては、非腫瘍部（炎症部）においては、pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞は組織幹細胞の存在部位に認められたが、腫瘍部では腫瘍の辺縁に散在性に認められ、数は増加していなかった。pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞の一部に BrdU の長期陽性細胞が認められ、組織幹細胞同様の slow-cycling な β カテニン陽性の腫瘍細胞であることが確認出来た。潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいては小胞体ストレスシグナル伝達経路の下流分子 $\text{elf-2}\alpha$ の脱リン酸化阻害薬 (salubrinal) を腹腔内投与して腸炎の改善効果を認めた (*13)

HTLV-1 感染ヒト化マウスモデルを用いた ATL 発症予防法の開発（微生物学）：

本邦には 100 万人以上のヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染者が存在し、約 5 % の生涯発症率で平均余命 1 年以内の悪性の白血病、成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症するが、ATL に対する治療法は未だに確立されていない。発症予防法や治療法の開発には感染モデル動物が必須であることから、重度免疫不全マウス (NOG あるいは NSG; NOD-SCID/IL-2 receptor γ chain knock-out) 骨髄内への臍帯血由来 CD133 陽性ヒト造血幹細胞の移植により、ヒトの造血系を持つヒト化マウスを作製し、これに HTLV-1 を感染させることで、感染 T 細胞の腫瘍性増殖、ATL に特徴的な花弁様分様核を有するリンパ球の出現等、ATL 様の病態を再現することに成功した。同感染マウスモデルにおいては、HTLV-1 感染に応答した種々のサイトカイン産生、抗 HTLV-1 IgG 抗体、および抗 HTLV-1 Tax 細胞障害性 T 細胞 (CTL) の発現も確認され、これまで発表されているヒト化マウスの系では不十分とされていたヒト宿主免疫の再構築が達成された (*23, 20)

HTLV-1 感染マウスに対する AZT および IFN- α 投与の有効性を検討したとこ

ろ、併用群においてはほぼ完全に感染細胞の増殖が抑制され、AZT/IFN 併用療法の有効性が確認された。

- 1) HTLV-1 の発がん蛋白 Tax の発現抑制作用が培養細胞レベルで示されている HSP90 阻害剤ゲルダナマイシンの低毒性誘導体 17-DMAG の個体レベルでの効果を検討したところ、感染細胞の増加が顕著に抑制され、さらに感染マウスの期間生存率も上昇した。
- 2) Tax 蛋白全長 (353aa) にわたる 12 種類の 40 アミノ酸長のロングペプチド混合物をアジュバントとともにヒト化マウス皮下あるいは鼻腔にワクチン投与後 HTLV-1 を感染したところ、感染細胞の増殖遅延と感染マウスの生存率上昇が観察された。

HTLV-1 感染細胞のヒト化マウスへの経口投与により、低レベルでの HTLV-1 感染が長期に維持される HTLV-1 感染無症候キャリアモデルが確立された。

組織造血幹細胞制御による難治性血液疾患の治療開発 (衛生学) :

本課題研究では、ヒト臍帯血由来未分化造血幹細胞 (HSC) の超高度純化と単一細胞レベルでの解析を目指して研究を推進した。並行して、HSC 支持能 (ニッチ機能) を持つヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) を樹立して、その HSC 支持機構の解明を目指した。ヒト臍帯血由来 18Lin-CD34-細胞を用いて、この分画に発現している HSC 特異的な分子、接着や遊走に関わる分子を網羅的に FACS 解析し、CD133 抗原を同定した。CD133 抗原はヒト臍帯血由来 CD34+/-HSCs の共通の陽性分子マーカーであることが初めて明らかにされた (*28) ヒト臍帯血由来 CD34-SRCs の高度濃縮マーカーとして glycosylphosphatidylinositol- anchored protein (GPI-80) を同定した (特願 2014-090292) (*25)。CD133 と GPI-80 に対する抗体を同時に用いることにより、ヒト臍帯血由来 CD34+/-HSCs を超高度に純化する方法を開発し、CD34+/-CD133+GPI-80+HSCs の頻度は、各々、1/5、1/8 と世界最高レベルであった (投稿中)。ヒト骨髄細胞由来 Lin-CD45- 細胞より、抗 CD271 及び抗 SSEA-4 抗体を用いることにより、間葉系幹細胞 (MSCs) を予期的に分離することにも成功した。CD271+ SSEA-4+細胞に由来する MSCs (DP MSCs) (特願 2013-170480) が、高い CD34-SRC 支持能 (ニッチ機能) を持つことを明らかにした (第 52 回米国血液学会発表)。この DP MSC を用いて CD34-SRC (HSC) とニッチにおける HSC/MSC の相互作用の解明を行ない、ヒト臍帯血由来 CD34+/-HSC と DP MSC の接着の重要性を明らかにした。(*26) ヒト HSC における THPO/MPL シグナルの機能的意義は明らかにされていなかった。CD34-MPL+SRC がヒト造血を一次マウスで 6 か月間維持する short-term HSC であること、CD34+MPL+SRC は、ヒト造血を二次マウスまで 1 年間維持する intermediate-term HSC であること、CD34+/-MPL-SRCs はヒト造血を三次マウスまで 1 年間以上維持する long-term HSC であることを初めて明らかにし

た (*24)

代謝シグナル破綻によるモデル疾患動物の開発と解析 (生体情報部門) :

免疫担当細胞の生存・分化・増殖過程においてエネルギー代謝レベルは厳密に制御されている。本研究では細胞増殖と密接に関わる mTORC1 経路に着目し、mTORC1 シグナルに必須のアダプター分子である Raptor 分子の細胞系譜特異的欠損マウスの樹立に取り組んだ。Raptor 分子を T 細胞系特異的に欠失させたところ、末梢のヘルパー T 細胞の機能分化が部分的に阻害されることが分かった。また、活性化に伴う T 細胞の生存率が mTORC1 シグナルの無い状態では著しく低下する可能性も示唆された。また、樹状細胞系譜特異的に Raptor 分子を欠損させると、腸管における従来型樹状細胞の IL-10 産生能の低下と、それに伴う腸管免疫応答の異常亢進が観察された。mTORC1 シグナルが、従来型樹状細胞において抑制性サイトカイン IL-10 の産生を介したホメオスタシス調節に関与することが明らかとなった (*32)。さらに B 細胞系譜特異的 Raptor 欠損マウスを樹立したところ、骨髄において B 細胞分化の停止が認められる一方、腸管においてのみ IgA 陽性の細胞が機能していることが明らかになった(投稿中)。一方、mTORC1 シグナルを負に制御する Tsc1B 細胞系譜特異的に欠失させるために mb1-Cre x Tsc1-flox マウスを樹立したところ、予想に反して B 細胞分化に大きな異常は認められなかったものの、100%の頻度で腎嚢胞を発症することが分かった。現在、この腎嚢胞マウスを利用して、腎嚢胞の発症のメカニズム解明に取り組んでいる。

慢性疼痛モデルによる神経可塑性(医化学) :

末梢神経再生動物モデル：神経再生には、細胞、場、増殖因子の 3 要素が必要である。我々は、末梢神経の再生機構を明らかにするために、坐骨神経(細胞)を切断し、切断端をシリコンチューブ(場)で接続し、増殖因子をはじめとして様々な物質を 4 週間持続的に注入できる末梢神経再生モデルを確立した。このモデルを Na チャネルの 1 つ $Na_v1.8$ のノックアウトマウスに適用して、神経細胞と支持細胞である Schwann 細胞の間で乳酸のエネルギーカップリングが、末梢神経再生に重要な役割をはたしていることを明らかにした。神経障害性疼痛動物モデル：NIPSNAP1、SCRAPPER、BEGAIN をはじめ、神経障害性疼痛や高次脳機能に関連する遺伝子を同定、それらの改変マウスを作製し、その機能解析・行動解析を行った。また、帯状疱疹後神経痛モデル、術後痛モデル、糖尿病モデルを作製し、その発生維持機構の解明、治療法の開発を行った (*38,36,34)。0vol1 遺伝子欠損マウス：0vol1 はショウジョウバエの卵形成に関与する転写因子 ovo のマウスホモログで ovo11 と ovo12 が存在する。我々がクローニングした ovo12 は ES 細胞に発現し、そのノックアウトマウスは胎生致死である。0vol2 は生殖原基や精巣に強く発現し、生殖細胞の形成に関与することを明らかにした。一方、ovo11 ノックアウトマウス

スは出生し、皮膚で表現型を示す。ovol2 と ovol1 の関係を ovol2 の皮膚でのコンディショナルノックアウトマウス、過剰発現マウスで検討した結果、Ovol2 は皮膚の幹細胞にも発現しており、ovol1 の遺伝子発現調節を行い、皮膚の表皮形成、皮膚のバリア機能形成に重要な役割をしていることを明らかにした (*35)

先天的恐怖と後天的恐怖の情報統合メカニズム(神経機能部門) :

本研究では、嗅覚刺激による先天的と後天的な恐怖情報の統合による行動制御という独自のモデルを用いて、この未知のメカニズムを分子レベルで解明することを目指した研究を実施した。チアゾリン類匂い分子の化学構造を人工ライブラリーを用いて最適化し、強力な先天的な恐怖行動の誘発活性を持つ匂い分子「チアゾリン類恐怖臭(thiazoline-related fear odors: tFOs)」の開発に初めて成功した。先天的な恐怖刺激の提示は、後天的な恐怖行動を抑制する活性を持ち、先天的な恐怖行動が後天的な恐怖行動に優先された。恐怖行動の統合に関与する脳領域を全脳活性化マッピング法により調べた結果、先天的な恐怖刺激は扁桃体中心核(CeA)を活性化するのに対して、後天的な恐怖刺激は扁桃体側方核(LA/BLA)にあった。さらにセロトニン2A受容体(HTR2A)の阻害薬が後天的恐怖行動を抑制する一方で、先天的恐怖行動を増悪させることが明らかになり、HTR2Aが先天的と後天的恐怖の拮抗的な統合を仲介している可能性が示唆された。CeAのHTR2A発現細胞が先天的と後天的な恐怖の拮抗的で階層的な制御を担う可能性を検証した結果、先天的恐怖刺激はCeA-HTR2A発現細胞の神経活動を抑制するが、この結果、先天的恐怖行動が増強されるとともに、後天的恐怖行動が抑制されることが解明された (*40)。

マルチカラー細胞系譜追跡マウスの開発による組織幹細胞とそのがん化の解析(病理学第一):

Cre-loxp システムを用いて幹細胞とその子孫細胞を蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子によって標識する細胞系譜追跡法は単細胞レベルで生体外に単離して移植する等の研究手法が使えない成体幹細胞にとって非常に強力かつ有用な研究手法である。しかしながら、現在一般的に行われている方法では、レポーター分子が1種類であるために、研究対象組織の幹細胞に非常に特異的なマーカーがあれば有用であるが、そうでない場合には限られた情報しか得ることができなかった。一方フローサイトメトリーを用いた成体幹細胞単離においては、複数の幹細胞マーカーを組み合わせる事で単離する幹細胞の純度を上げることが一般的になっている。今回の研究プロジェクトでは複数の幹細胞マーカーを組み合わせることで細胞を標識する細胞系譜追跡法の新手法の開発に取り組んだ。小腸上皮幹細胞の自己複製におけるWnt経路関連増殖因子のうち、FzdリガンドのWntとLgr5リガンドの

Rspondin の役割分担について解析した (*44)。また、マウスモデルを使って大腸がんにおけるがん幹細胞候補細胞の挙動と起源を明らかとした。また、舌癌においても Bmi1 ががん幹細胞マーカーとして機能することが明らかとした (*43, 45)。

網膜変性症モデルの開発と病態制御ならびに腫瘍モデルによる制御物質の同定 (病理学第二) :

アルキル化剤であるメチルニトロソ尿素 (MNU) のラットへの単投与は乳腺をはじめ種々の臓器に発癌を促すことにより臓器癌モデルの作出でき、網膜視細胞にアポトーシスをきたすことより網膜変性症のモデルを作出できる。これらのモデル動物を用いて脂肪酸のうちアラキドン酸とミード酸、ウコンの黄色欠素であるクルクミン、カテキン類を含む緑茶抽出物、さらにヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) の効果を検討した。アラキドン酸の胎仔期から乳仔期という発育期での投与は、MNU 誘発網膜変性症の軽減に有効であった。一方、クルクミンや緑茶抽出物の成熟動物への投与は MNU 誘発網膜変性症を軽減した。MNU 誘発乳癌は高率にホルモン依存性であるが、MNU 誘発乳癌の発生をモニターすることにより、妊娠ホルモンのひとつである HCG の投与や n-9 脂肪酸であるミード酸は MNU 乳癌を抑制し、乳癌に対して制癌作用を有することが判明した (*51, 52, 47, 48, 49, 50)。歯原性腫瘍は人工製が困難である。我々は低率ながら MNU により歯原性腫瘍の作製に成功した経験から、現在緑茶抽出物の MNU 誘発歯原性腫瘍に対する影響につき検討中である

疾患モデルマウス作製方法の開発 (モデル動物部門) :

24 年度から現在までに、14 系統の ES 細胞を樹立し、この ES 細胞を 8 細胞期胚に移植することでキメラマウスの作製を試みた。その内の 10 系統はキメラマウスの作製に成功した。さらに、作製したキメラマウスの 7 系統で、生殖系列にのる遺伝子改変マウスの作製に成功した (*53, 54, 57)。作製した遺伝子改変マウスの生産効率を高めるための技術として、3 週齢雌マウスを使用した体外受精によって、自然交配よりも早いサイクルでの産子獲得や、麻酔処置後に生存したまま片側の精巣上体尾部を採取する事で貴重なマウスを残したままの体外受精が可能であった。また、26 年度からは CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた KO マウスの作成にも着手し、シグナル誘導増殖関連遺伝子である Sip1 の KO マウス作製を行った。CRISPR/Cas9 で plasmid を用いた前核注入法を採用し、生存前核卵子と 2 細胞期まで発生した胚を移植した結果、11/40 (28%) が産子として得られ、その内の 3 匹は数塩基~数百塩基の欠損を認めた。また、多様な疾患モデルマウスの中には、排卵障害を持つものも存在しており、卵巣からの未成熟卵子を体外で受精可能な卵子まで発生させる体外成熟技術を用いた体外受精に関しても研究を進めている。

グリア・ニューロン相関を解析するモデル(解剖学第一) :

1) 硫酸化糖脂質欠損マウスおよびcuprizone誘発性脱髄疾患モデルに関する研究 : エストロゲン受容体 (Gタンパク質結合型受容体 30 ; GPR30) が希突起膠細胞分化過程の全段階で発現している。そこで、cuprizone 投与で脱髄を起こさせた多発性硬化症モデル動物ラットを作出し、髄鞘形成各期において GPR30 のアゴニスト G1 などの薬剤投与をおこない、免疫組織化学をおこなった。その結果、GPR30 を介して希突起膠細胞の分化成熟および髄鞘形成が促されることを突き止めた。すなわちエストロゲンの希突起膠細胞に対する作用を明らかにした(*62)。 脊髄後根神経節では、神経節細胞およびそこから出た突起を被う末梢のグリア細胞の特質を明らかにするとともに、その細胞動態や細胞亜種分類を試みた。その結果、未分化な指標とされてきた Sox2 が成熟した細胞群にも存在し新たな機能が推察された(*60)。 2) マウス中大脳動脈閉塞モデル : マウス側頭骨部切開により中大脳動脈に到達、この動脈を焼灼して片側終脳の永久脳梗塞モデル動物を作出した。脳梗塞発症後のニューロン-グリア相関、とりわけそのクロストークに関与する因子について研究をおこなった。新規的発見として、ニューロステロイドの一種である胆汁酸が梗塞部位に集積する事を見出した。

iPS 細胞療法の基礎研究(解剖学第二) :

(1) 神経系由来の細胞をもとに樹立した iPS 細胞の未分化性及び多分化能について検討した。Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lyn28 の 5 つのリプログラミング遺伝子をコードしたトランスポゾンベクターを用いて、マウス由来神経上皮細胞 (NE4C) から iPS 細胞へのリプログラミングを行った。樹立した iPS-NE4C 細胞は SSEA1 由来の強い蛍光シグナルを発し、未分化性を有することが示された。さらに、iPS-NE4C 細胞を分化させ、三胚葉系への多分化能を有することが示された。(2) 中枢神経系は、再生能力が低いことが知られているため、iPS 細胞療法の重要なターゲットとなる。分化させた iPS 細胞には、多くの細胞種が混在するため、神経幹細胞特異的に薬剤耐性遺伝子を発現する iPS 安定発現細胞を樹立し薬剤選択することで、神経幹細胞を簡便に純化させる方法を考案した (*65)。

脳内神経伝達物質の破綻による疾患モデルの作成と評価 (生理学第二) :

セロトニンは精神神経疾患の治療薬にもその作用薬が多く、情動や意思決定などに影響を及ぼす神経メカニズムの同定は重要であり、サルを用いて解析するシステムを構築することを目的とした。そのため、げっ歯類で使用されているウイルスベクターを用いて細胞に選択的に DREADD やチャンネルロドプシンを発現させ、セロトニン細胞のみを選択的に機能促進・抑制する方法をサルに応用することを試みた。サルの背側縫線核の位置を、MRI 画像及び電気生理学的に同定し、神経活動を記録しながら刺入しウイルスベクターを

注入した。その結果、注入部位および投射部位において光刺激にも十分反応することが明らかになった。今後、この系を用いてサル（サル）の精神疾患モデルの作成を試みる。

自閉症におけるプロトカドヘリンの役割（生物学）：

自閉症関連遺伝子であるプロトカドヘリン9のノックアウトマウスの行動解析を理化学研究所若菜成晴博士と共同研究を行い、このマウスが新奇物体を避ける傾向にあるなど情動が行動に異常があることがわかった。また、理化学研究所永雄総一博士との共同研究により視機性眼球反応に異常があることも分かった（未発表）。これらの異常の原因部位や細胞を同定するために理化学研究所との共同研究でプロトカドヘリン9のコンディショナルマウスの作製にとりかかった。これまでに Floxed マウスを作製できたので、今後、解析を進める予定である。

疾患モデル動物における再生医療の応用と高度不飽和脂肪酸の生活習慣病予防と治療（公衆衛生学）：

下丘における加齢にともなう GluN1 遺伝子の発現制御：C57BL/6J マウスの下丘において、加齢性難聴（加齢性難聴）に関係すると考えられる遺伝子発現変化を cDNA microarray を用いて解析した。その結果、middle-aged 群での NMDA receptor subunit ζ 1 (GluN1) 遺伝子の著明な発現低下を認めた。young 群と middle-aged 群の組織中の発現を in situ hybridization を用いて比較した結果、middle-aged 群では陽性細胞数が減少していることを認めた。不飽和脂肪酸の肝臓及び脳へ与える影響をラットモデルで検討した結果、DHA-LPC 摂取は血清および肝臓（肝臓）の中性脂質とコレステロール濃度の低下や血清中の DHA 含量を増加させるが、脳の DHA 濃度には影響しないことが示唆された。

免疫原性血小板減少症のモデルマウス開発とその病態解明（内科学第一）：
特発性血小板減少性紫斑病（ITP）は抗血小板抗体の産生により血小板が減少し、出血傾向を来す疾患として知られが、適切なITPモデルマウスはいまだ確立されていない。まず抗血小板抗体産生過程およびその機序を樹状細胞との関連において再検討した。その結果、活性化血小板が樹状細胞の接着共刺激分子（CD40、CD86）の発現増強をもたらし、胸線間質リンパ球増殖因子（TSLP）との協働作用により免疫応答をよりTh2方向にシフトさせ、アレルギーあるいは抗体産生側への偏向を誘導していることが示唆された。上記の成果を念頭に置き、ヒト血小板を投与することでヒト/マウス血小板交差反応性を利用して抗血小板抗体産生を試みる予定である。なお応答のTh2側への偏向を助長するためのAlumアジュバントの使用、投与前の血小板の活性化などを念頭に置きモデルマウスの作出を検討している。

糖尿病性心筋障害モデルマウスの作成と病態解析（内科学第二）：

糖尿病が冠動脈疾患の重要な危険因子であるが、冠動脈に有意な狭窄がないにもかかわらず心機能障害がみられる糖尿病性心筋障害とよばれる患者が存在する。糖尿病性心筋障害の分子機構に関して不明であるが、我々は心筋におけるインスリン抵抗性がその基盤病態として存在するのではないかと想定した。本研究では成人期に心筋特異的にインスリン受容体を欠損させ、心筋細胞だけにインスリン抵抗性が存在するようなマウスを作成し、その心機能を解析した。まず、tamoxifen投与によって心筋特異的にインスリン受容体遺伝子を欠損するマウスを樹立し、このマウスに生後12週から2週間tamoxifenを投与すると、2週間後にはインスリン受容体の発現レベルは著明に低下し、tamoxifen誘導型心筋特異的インスリン受容体欠損マウスが得られ、心重量の減少と心機能の低下が認められた。インスリン受容体によるAkt-mTOR経路のシグナルが選択的に減弱し、mTORを活性化すると心重量減少・心機能低下ともに改善がみられた。今後、この糖尿病性心筋障害モデルを用いてAkt-mTOR経路の機能を解明する。

疾患モデル動物の開発と解析：難治性ヒト疾患の病態解明と診断・治療への応用（外科学）：

1) ラット正所性腓膵腫瘍モデルにおけるゲムシタビン（GEM）療法後の α -SMA陽性筋線維芽細胞様細胞活性の検討した。DSL-6A/C1細胞を用いて正所性腓膵癌ラットを作製し、GEM化学療法を行った。In vitroにてGEMと共培養するとDSL-6A/C1細胞増殖は有意に抑制され、腓膵癌ラットの生存期間はGEM治療群では有意に改善した。GEM治療群の腓膵組織中の α -SMAの発現は有意に減少したが、シリウス赤染色実験では有意差は認めなかった。GEM治療にてVEGFの発現は有意に減少したが、TGF- β 1発現は阻害されなかった。これらの結果は、GEMは腫瘍増殖を抑制するばかりでなく、VEGF発現を減少させる事で腓膵細胞の抑制を強いていると考えられた(*79)。 2) ラット腓膵癌におけるアンギオテンシンIIタイプ1受容体拮抗剤；ロサルタン（LOS）の抗腫瘍効果を検討した。DSL-6A/C1細胞を用いて腓膵癌モデルを作成しコントロール群とGEM群、LOS群、GEM + LOS併用群の4群に分けて実験を行った。その結果、GEMとLOSの併用は、アンギオテンシンIを介したVEGF合成を阻害し細胞増殖を抑制する事によって、ラット腓膵癌の生存期間を有意に改善したと考えられた(*78)。

難治性ヒト疾患モデル動物を用いた組織欠損に対する修復、再生、再建の実験的研究（形成外科学）：

1. 軟部組織再建モデル：ラット背部に創傷治癒ならびに再建のための実験モデルとして規格化した実験的皮弁を作成して延長効果を判定した。皮弁の下への薬剤投与にて差異を検討した。多血小板血漿（PRP：platelet-rich

plasma) による効果の有効性が得られ、血管増生や皮弁延長効果の結果が得られている (*83)。 2. 難治性皮膚潰瘍治癒モデル:ラット背部に規格化したモデル創傷を作成し、これに対して開放創、ゼラチン、PRP、ゼラチン+PRP での比較検討を行い、創傷に治癒、組織、血管増生の検討を行った。ゼラチン+PRP 適応で、有意に皮膚潰瘍の治癒傾向を認め、組織学的、血管増生、肉芽増生など有意な所見を得た(*82)。 3. 骨再生モデル:若齢ラットと老齢ラットにての腓腹筋内への一定の空隙を作成して、異所性骨再生モデルを設定し、骨形成タンパク (rhBMP : recombinant human Bone Morphogenetic Protein) の埋入で有意に若齢ラットの誘導骨が得られ、この骨質、骨髄などを精査して老齢ラットでの誘導骨との比較を行った (*81, 84)。

難治性気道炎症性疾患における好酸球の機能的役割の検討 (耳鼻咽喉科・頭頸部外科学) :

難治性好酸球性気道炎症では、上気道の炎症を治療すると下気道の症状も改善することが知られており、そのメカニズムに関して上・下気道間に神経学的な interaction、nasal-bronchial reflex (NBR) を介した経路が存在していると推察されているが、十分に解明されていない。本研究では好酸球性気道炎症においてどのように上気道と下気道が interaction しているかを解明するため、上気道抵抗(鼻腔抵抗)と下気道抵抗を同時に測定するシステムを構築した。次に、好酸球の炎症局所での役割を検討するためには、好酸球の動態を追跡することが出来る遺伝子マウスを用いた検討が必要となる。しかし、好酸球を蛍光タンパク質などで発光させ追跡する事が出来るような遺伝子改変マウスは存在していないため、新しい遺伝子改変マウスの作製を進めている。一方、肺の炎症モデルの生体イメージングは、KMU コンソールによる助成を得て、分子遺伝学部門と連携して立ち上げに成功した。これらの系を統合し、難治性気道炎症の解析を進める。

眼疾患モデルによる病態解明と新規治療法の開発 (眼科学) :

臨床テーマである加齢黄斑変性に対してはレーザー誘発脈絡膜新生血管の発生モデル、緑内障については水圧を利用した虚血-再灌流モデル、糖尿病網膜症に対しては、低酸素網膜症モデルを確立した。また、レーザー誘発脈絡膜新生血管発生モデルに代表される網膜下に発育する脈絡膜新生血管モデルではなく、網膜色素上皮下に発育する脈絡膜新生血管モデルの作成を試みているが、モデル動物の作成には至っていない。

骨髄移植を用いた SKG/Jcl マウスの関節破壊ならびに骨粗鬆症の解明 (整形外科学) :

関節リウマチなどの自己免疫疾患で骨粗鬆症が進行する。炎症の原因となる未分化骨髄細胞 (造血系細胞ならびに間葉系細胞) を正常骨髄細胞と置換す

ることにより、骨粗鬆症の自然経過を正常に戻すことが可能か、SKG/jc1 関節炎自然発症モデルを用いて解析した。このマウスにドナーである C57/B6 マウスの全骨髄細胞を骨髄内骨髄移植することにより、SKG/jc1 マウスの骨髄（造血系細胞）はドナー型に置換されていた。さらに、骨内にある骨芽様細胞（間葉系細胞）もドナー由来に置換されていた。臨床的には SKG/jc1 マウスの関節炎は消失し、尿中 DPD は正常マウスと同様の自然経過となっていた。難治性自己免疫疾患の治療として、白血球除去療法 (LCAP) があるが、根治的治療法として骨髄細胞移植が有用であることが示唆された (*87)

脊髄損傷に対する動物モデルの作成と細胞治療の開発に向けて（救急医学）：

受傷後の亜急性期、慢性期に同様の処置を行った場合に効果が期待出来ないか、を調べるために、動物実験にて脊髄損傷モデルを作成し、1-4 週後の亜急性期、慢性期に骨髄間質細胞の髄液内投与にて神経機能の再生が得られないかを調べた。動物実験にて同種の GFP-transgenic rat の骨髄間質細胞を培養し、損傷ラットの第 4 脳室内に毎週 1 回計 3 回髄注した。運動機能 (BBB score) は対照群と比較して有意な差を認めた。組織学的にも Schwann cell を伴った多数の axon が遠位方向にも近位方向にも伸びていることが確認出来た。受傷後亜急性期、慢性期においても髄液内に投与した骨髄間質細胞は neurotrophic source として作用した後、消滅することにより、安全に再生効果が期待出来るものと考えられた。

パーキンソン病モデルラットによるレボドパ誘発ジスキネジア (LID) の発症と線条体での遺伝子発現の変化についての研究（神経内科学）：

ラットの一側内側前脳束に 6-OHDA を局所投与し、一側パーキンソン病モデルラットを作製した。これを三群に分け、①無治療、②レボドパ持続投与（浸透圧ポンプ）、③レボドパ間欠投与（一日二回腹腔内注射）の処置を 2 週間行った後、レボドパ誘発性ジスキネジア (LID) の発症と、線条体におけるドパミン D1、D2 受容体、アデノシン A2A 受容体の mRNA の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR で測定し術側と健側で比較した。LID は②では発症せず③では発症した。ドパミン受容体発現量は①では変化は無かったが、②では D2 受容体のみ術側で増加し、③では D1、D2 受容体共に術側で増加した。A2A 受容体は③のみ術側で増加していた。LID はレボドパ間欠投与で発症し、D1 および A2A 受容体の増加が関連している。この変化を抑制することが LID の発症予防につながる可能性がある (*90)。

紫外線皮膚障害修復機構における表皮メラノサイト（皮膚科学）：

メラニンには紫外線防御能力の大きいユーメラニンと紫外線感受性の高いフェオメラニンの 2 種類が存在している。ヒトでは表皮にメラノサイトが存在するが、マウスのメラノサイトは真皮に存在するので、ヒトの皮膚組織の

研究においてマウスを実験動物として用いることには制限がある。ヒトのようにメラノサイトを表皮に有するマウスは既に存在しているが、かかるマウスにおけるメラノサイト発現量は過剰なものであり、異常な色素沈着が見られるので実験動物としては不適切なものであった(J Invest Dermatol, 125, 521, 2005)。そこでバッククロスを何度も行うことにより表皮内ユーメラニンの含有量が少なく、フェオメラニンの含有量の多い新しい SCF-Tg マウスを作製した。このマウスはフェオメラニン含有量が多く、ユーメラニン含有量が少ないため通常の SCF-Tg マウスより格段に紫外線感受性が高く、ヒトの皮膚により近いと考えられる(特許番号 第 4406696 号)。このマウスを用いることにより、外用する成分の紫外線発癌機能や Sunscreen 剤としての能力を検討することができた。

＜優れた成果が上がった点＞

1. LTBP-2 欠損により生じる水晶体脱臼に対し、LTBP-4 の過剰発現による治療の可能性を示した。本研究において作成した遺伝子変異マウスは肺気腫や水晶体脱臼などの疾患におけるモデルマウスとして利用できることがわかった。
2. 接着制御破綻によっておこる自己免疫病態モデルを作出できた。生体組織イメージング技術等を樹立し接着調節が生体防御だけでなく自己寛容の確立・維持にも関与していること、その破綻が自己免疫発症につながることを明らかにできた。
3. CD133 陽性ヒト造血幹細胞を NOG マウスの骨髄内に直接移植することで、高い移植効率の達成に成功した。同マウスモデルを用いて、複数の候補薬剤の投与実験において個体レベルでの抗 HTLV-1 活性が実証されたことから、今後、さらなる化合物の同定と、作用機序解明への応用が期待される。
4. ヒト臍帯血由来造血幹細胞の濃縮分子マーカーとして、CD133 および GPI-80 (特願 2014-090292) の同定に成功した。
5. Tsc1 遺伝子改変マウスによって全く新しい腎嚢胞の病態モデルを見出した。

＜課題となった点＞

遺伝子改変マウスの作成は従来の ES 細胞を用いたジーンターゲットング法は時間がかかり、ゲノム編集による迅速な遺伝子改変マウスの学内作成が研究促進に不可欠である。Crspr/Cas9 を用いた方法は可能になったが、まだ支援体制としては不十分である。

<自己評価の実施結果と対応状況>

研究者による中間評価に基づき、連携促進を図る。学長のリーダーシップにより促進されるプロジェクトについて資金援助、私学振興学術研究（学術研究、若手奨励研究）の採択課題支援、さらに連携を促す試みとして学内研究紹介の毎月開催（研究トークランチ）、学内研究助成（KMU コンソーシアム）を行う。

<外部(第三者)評価の実施結果と対応状況>

該当なし

<研究期間終了後の展望>

大学による疾患モデル動物センターの支援を継続し、展開研究および未発表の疾患モデル動物プロジェクトを促進する。これらの疾患モデル動物を学内研究資源として独自性の高い基礎・臨床研究の連携による研究を発信する。

Ⅲ. 原著論文リスト

(薬理学)

- *1. Fujikawa Y, Yoshida H, Inoue T, Ohbayashi T, Noda K, von Melchner H, Iwasaka T, Shiojima I, Akama TO, Nakamura T, Latent TGF- β binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development. *Sci. Rep.* レフェリー有 7:43714, 2017.
2. Kageshima M, Maruyama T, Akama T, Nakamura T, Novel magnetic indenter for rheological analysis of thin biological sheet for regenerative medicine. *Rev. Sci. Instrum.* レフェリー有 87:074302, 2016.
- *3. Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, Horiguchi M, Kameyama K, Hata Y, Takahashi K, Kusumoto K, Nakamura T, Latent TGF β binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils. *Hum Mol Genet.* レフェリー有 23(21):5672-82. 2014.
- *4. Noda K, Dabovic B, Takagi K, Inoue T, Horiguchi M, Hirai M, Fujikawa Y, Akama TO, Kusumoto K, Zilberberg L, Sakai LY, Koli K, Naitoh M, von Melchner H, Suzuki S, Rifkin DB, Nakamura T, Latent TGF β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* レフェリー有 110(8):2852-7, 2013.

(分子遺伝学部門)

- *5. Kondo N, Ueda Y, Kita T, Ozawa M, Tomiyama T, Yasuda K, Lim DS, Kinashi T, NDR1-dependent regulation of kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. *Mol Cell Biol.* レフェリー有 2017 Jan 30. pii: MCB.00424-16. doi: 10.1128/MCB.00424-16. [Epub ahead of print] 2017
- *6. Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. *J Immunol.* レフェリー有 196(7):3019-31.2016
- *7. Yasuda K, Ueda Y, Ozawa M, Matsuda T, Kinashi T, Enhanced cytotoxic T cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency. *FEBS Letter* レフェリー有 590(1):68-75. 2016.

- *8. Fukuhara T, Tomiyama T, Yasuda K, Ueda Y, Ozaki Y, Son Y, Nomura S, Uchida K, Okazaki K, Kinashi T. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. *BBRC*. 463(4):968-74. 2015.
- *9. Katakai T, Kondo N, Ueda Y, and Kinashi T, Autotaxin Produced by Stromal Cells Promotes LFA-1–Independent and Rho-Dependent Interstitial T Cell Motility. *J Immunol* レフェリー有193:617-626, 2014
- *10. Katakai T, Habiro K, Kinashi T. Dendritic Cells Regulate High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node via LFA-1/ICAM-1. *J Immunol* レフェリー有191(3):1188-99. 2013
- *11. Tomiyama T, Ueda Y, Katakai T, Kondo N, Okazaki K, Kinashi T. Antigen-specific suppression and immunological synapse formation by regulatory T cells require the mst1 kinase. *PLoS One*. レフェリー有8(9):e73874, 2013.
- *12. Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T, Ikehara S, Matsumoto M, Kinashi T, Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen-recognition in the thymus. *Nat. Commun.* レフェリー有3:1098. 2012

(内科学第三)

- *13. Sakao M, Sakaguchi Y, Suzuki R, Takahashi Y, Kishimoto M, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. Smad2/3 Linker Phosphorylation Is a Possible Marker of Pancreatic Stem/Progenitor Cells in the Regenerative Phase of Acute Pancreatitis. *Pancreas*. レフェリー有 46:605-613. 2017
- 14. Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- α Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. *J Immunol*. レフェリー有 195(7):3033-44. 2015
- *15. Toyonaga T, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Yoshino T, Honzawa Y, Ito A, Namba K, Minami N, Yamada S, Koshikawa Y, Uede T, Chiba T, Okazaki K. Osteopontin Deficiency Accelerates Spontaneous Colitis in Mice with Disrupted Gut Microbiota and

Macrophage Phagocytic Activity. *PLoS One*. レフェリー有 10(8):e0135552. 2015

16. Fukuhara T, Tomiyama T, Yasuda K, Ueda Y, Ozaki Y, Son Y, Nomura S, Uchida K, Okazaki K, Kinashi T. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. レフェリー有 *Biochem Biophys Res Commun*. 463(4):968-74. 2015
17. Suzuki R, Fukui T, Kishimoto M, Miyamoto S, Takahashi Y, Takeo M, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. *J Crohns Colitis*. レフェリー有 9:565-74 2015
- *18. Okazaki T, Nishio A, Takeo M, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Okazaki K. Inhibition of the Dephosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 α Ameliorates Murine Experimental Colitis. *Digestion*. レフェリー有 90(3):167-178 2014

(微生物学)

19. Fujisawa J, Lee SI, Yao J, Ren Y, Tanaka M. Tax peptide vaccine suppressed the leukemia in humanized mouse. *Retrovirology* レフェリー無, 12(Suppl1), O43, 2015
- *20 Tezuka K, Xun R, Tei M, Ueno T, Tanaka M, Takenouchi N and Fujisawa J. An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. *Blood* レフェリー有 123, 346-355, 2014
21. Tezuka T, Tei M, Ueno T, Xun R, Fujisawa J, Carrier model of HTLV-1 infection in humanized NOG mice. *Retrovirology* レフェリー無 11(Suppl1), P43, 2014
22. Tezuka T, Tei M, Ueno T, Xun R, Iha H, Fujisawa J, Inhibition of ATL development in humanized mouse model by AZT/INF treatment. *Retrovirology* レフェリー無, 11(Suppl1), P43, 2014
- *23. Ikebe E, Kawaguchi A, Tezuka K, Taguchi S, Hirose S, Matsumoto T, Mitsui , Senba K, Nishizono A, Hori M, Hasegawa H, Yamada Y, Ueno T, Tanaka Y, Sawa H, Hall W, Minami Y, Jeang K-T, Ogata M, Morishita K, Hasegawa H, Fujisawa J, and Iha H, Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes

tumor-cell in filtrationin to multiple organs and improves survival period for ATL model mice. *Blood Cancer Journal* レフェリー有 3, e132(ページなし), 2013

(衛生学)

- *24. Matsuoka Y, Takahashi M, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sonoda Y, CD34 Antigen and the MPL Receptor Expression Defines A Novel Class Of Human Cord Blood-Derived Primitive Hematopoietic. Stem Cells. *Cell Transplantation*, レフェリー有 in press.
- *25. Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sonoda Y: GPI-80 Expression Highly Purifies Human Cord Blood-derived Primitive CD34-negative Hematopoietic Stem Cells. *Blood* レフェリー有 128(18):2258-2260,2016.
- *26. Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, Kawamura H, Takahashi M, Fujioka T, Uemura Y, Asano H, Sasaki Y, Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Hino M, Sonoda Y: Prospectively Isolated Human Bone Marrow Cell-derived MSCs Support Primitive Human CD34-negative Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells* レフェリー有 33:1554-1565, 2015.
- 27. Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y: Human Cord Blood-derived CD34-negative Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are Myeloid-biased Long-term Repopulating HSCs. *Blood Cance J* , レフェリー有 5:e290;doi:10.1038/bcj. 2015.
- *28. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, Sasaki Y, Matsui K, Asano H, Kaneko K, Sonoda Y: CD133 is a Positive Marker for a Distinct Class of Primitive Human Cord Blood-derived CD34-negative Hematopoietic Stem Cells. *Leukemia* レフェリー有 28:1308-1315, 2014.

(生体情報部門)

- 29. Hoshii T, Kasada A, Hatakeyama T, Ohtani M, Tadokoro Y, Naka K, Ikenoue T, Ikawa T, Kawamoto H, Fehling HJ, Araki K, Yamamura K, Matsuda S, and Hirao A, Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA. レフェリー有 111: 3805-3810.2014

30. Hirata Y, Sugie A, Matsuda A, Matsuda S, and Koyasu S, TAK1-JNK axis mediates survival signal through Mcl1 stabilization in activated T cells. *J. Immunol.* レフェリー有 190: 4621-4626. 2013
31. Takayama G, Ohtani M, Minowa A, Matsuda S, and Koyasu S, Class I PI3K-mediated Akt and ERK signals play a critical role in Fc ϵ RI-induced degranulation in mast cells. *Int. Immunol.* レフェリー有 25: 215-220. 2013
- *32. Ohtani M, Hoshii T, Fujii H, Koyasu S, Hirao A, and Matsuda S, mTORC1 in intestinal CD11c⁺CD11b⁺ dendritic cells regulates intestinal homeostasis by promoting IL-10 production. *J. Immunol.* レフェリー有 188: 4736-4740. 2012
33. Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Ohtani M, Ichiyama K, Baba Y, Yamada T, Egami S, Hoshii T, Hirao A, Matsuda S, and Koyasu S, PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of ROR γ *Cell Reports* レフェリー有 1: 360-373. 2012

(医化学)

- *34. Uchida H, Matsumura S, Okada S, Suzuki T, Minami T, and Ito S, RNA editing enzyme ADAR2 is a mediator of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *FASEB J.* レフェリー有 in press, 2017.
- *35. Hayashi M, Shinozuka Y, Shigenobu S, Sato M, Sugimoto M, Ito S, Abe K, and Kobayashi S, Conserved role of Ovo in germline development in mouse and Drosophila. *Sci. Rep.* レフェリー有 7, 40056, 2017.
- *36. Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao Y, Ito S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. *eNeuro*, レフェリー有 3, e0110-16(1-18), 2016.
- *37. Lee B, Villarreal-Ponce A, Fallahi M, Ovadia J, Sun P, Yu QC, Ito S, Sinha S, Nie Q, and Dai X, Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev. Cell* レフェリー有 29, 47-58, 2014.

- *38. Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tsubouchi S, Kiyonari H, Iwamatsu A, Noda T, Handa H, and Ito S. Identification of NIPSNAP1 as a nocistatin-interacting protein involving pain transmission. *J. Biol. Chem.* レフェリー有 287, 10403-10413, 2012.

(神経機能部門)

39. Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kizumi M, Hamana H, Tsuboi A, Hirono H. Supersensitive detection and discrimination of enantiomers by dorsal olfactory receptors: evidence for hierarchical odour coding. *Scientific Reports* レフェリー有 5: 14073. 2015
- *40. Isosaka T, Matsuo T, Yamaguchi T, Funabiki K, Nakanishi S, Kobayakawa R*, Kobayakawa K*. Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy between innate and learned fear. (* corresponding authors) *Cell* レフェリー有 163, 1153-1164. 2015
41. Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itohara S, Kawasaki M, Tsuboi A & Hirono J. Supersensitive odor discrimination is controlled in part by initial transient interactions between the most sensitive dorsal olfactory receptors and G-proteins. *Receptors & Clinical Investigation* レフェリー有 3, e1117. 2016

(病理学第一)

42. Yan KS, Janda CY, Chang J, Zheng GXY, Larkin KA, Luca VC, Chia LA, Mah AT, Han A, Terry JM, Ootani A, Roelf K, Lee M, Yuan J, Li X, Bolen CR, Wilhelmy J, Davies PS, Ueno H, von Furstenberg RJ, Belgrader P, Ziraldo SB, Ordonez H, Henning SJ, Wong MH, Snyder MP, Weissman IL, Hsueh AJ, Mikkelsen TS, Garcia KC, and Kuo CJ. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem cell self-renewal, *Nature*. レフェリー有 545(7653):238-242. 2017
- *43. Yanai H, Atsumi N, Tanaka T, Nakamura N, Komai Y, Omachi T, Tanaka K, Ishigaki K, Saiga K, Ohsugi H, Tokuyama Y, Imahashi Y, Ohe S, Hisha H, Yoshida N, Kumano K, Kon M and Ueno H. Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion. *Sci. Rep.*

レフェリー有 8;7:41838. 2017

- *44. Tanaka T, Atsumi N, Nakamura N, Yanai H, Komai Y, Omachi T, Tanaka K, Ishigaki K, Saiga K, Ohsugi H, Tokuyama Y, Imahashi Y, Hisha H, Yoshida N, Kumano K, Okazaki K, and Ueno H.(2016)Bmi1-positive cells in the lingual epithelium could serve as cancer stem cells in tongue cancer. *Sci. Rep.* レフェリー有り 6:39386. 2016
- *45. Ueno H. Identification of normal and neoplastic stem cells by the multicolor lineage tracing method. *Pathol. Int.* レフェリー有 66(8): 423-430.2016
46. Hisha H, Tanaka T, Ueno H. Lingual Epithelial Stem Cells and Organoid Culture of Them. *Int. J. Mol. Sci.* レフェリー有 17(2). pii: E168. 2016

(病理学第二)

- *47. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Tsubura A. Susceptibility to N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in different rat strains. *J Toxicol Pathol.* レフェリー有 29(1):67-71. 2016。
- *48. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Tsubura A. Green tea extract attenuates MNU-induced photoreceptor cell apoptosis via suppression of heme oxygenase-1. *J Toxicol Pathol.* レフェリー有 29(1):61-5. 2016.
- *49. Kinoshita Y, Yoshizawa K, Emoto Y, Yuki M, Yuri T, Shikata N, Elmore SA, Tsubura A. A spontaneously occurring malignant ovarian Sertoli cell tumor in a young Sprague Dawley rat. *J Toxicol Pathol.* レフェリー有 29(1):53-9. 2016.
- *50. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Yoshikawa Y, Sayama K, Tsubura A. Green tea extract-induced acute hepatotoxicity in rats and a literature review. *J Toxicol Pathol* レフェリー有 27(3-4):163-74. 2014
- *51. Yoshizawa K, Uehara N, Kimura A, Emoto Y, Kinoshita Y, Yuri T, Takada H, Moriguchi T, Hamazaki T, Tsubura A. Promoting effect of arachidonic acid supplementation on N-methyl-N-nitrosourea-induced pancreatic acinar cell hyperplasia in young Lewis rats. *Oncol Lett* レフェリー有 5(1): 76-82, 2013.

- *52. Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Kimura A, Uehara N, Yuri T, Tsubura A. Arachidonic acid supplementation does not affect N-methyl-N-nitrosourea-induced renal preneoplastic lesions in young Lewis rats. *Oncol Lett* レフェリー有 5(4): 1112-1116, 2013.

(モデル動物部門)

- *53. Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. *J Immunol.* レフェリー有. 196(7):3019-31. 2016.
- *54. Yasuda K., Ueda Y., Ozawa M., Matsuda T., Kinashi T., Enhanced cytotoxic T cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency. *FEBS Letter.* レフェリー有. 590(1):68-75. (2016) doi: 10.1002/1873-3468.12045.
55. 安齋政幸、井上達也、西村愛美、野田義博、東里香、梶本みずき、三谷匡、細井美彦. β -Nicotinamide mononucleotide を添加したマウス体外成熟培地が無成熟卵子内への活性酸素種(ROS)に与える影響. 日本受精着床学会雑誌. レフェリー有. 33:21-26.2016.
56. 井上達也、東里香、野田義博、西村愛美、梶本みずき、小橋朱里、折杉卓哉、安齋政幸. L-カルニチン添加体外成熟培地が無成熟卵子細胞質内活性酸素種に与える影響. 近畿大学先端技術総合研究所紀要. レフェリー有. 21:49~56.
- *57. Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Etoh K, Fukuda M, Kinashi T, Katagiri K. Rab13 acts downstream of the kinase Mst1 to deliver the integrin LFA-1 to the cell surface for lymphocyte trafficking. *Sci. Signal.* レフェリー有 .7:ra72 (2014) DOI: 10.1126/scisignal.2005199

(解剖学第一)

58. Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H. Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry. *J Neurochem* レフェリー有 140(3): 435-450, 2017.
59. Tanaka S, Takizawa N, Honda Y, Koike T, Oe S, Toyoda H, Kodama T, Yamada H, Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response. *Brain Behav Immun* レフェリー有

57: 58-67, 2016.

- *60. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Takamori Y, Hirahara Y, Yamada H , Sox2 in the adult rat sensory nervous system. *Histochem Cell Biol* レフェリー有 141(3): 301-309, 2014.
61. Mori T, Wakabayashi T, Ogawa H, Hirahara Y, Koike T, Yamada H, Increased histone h3 phosphorylation in neurons in specific brain structures after induction of status epilepticus in mice. *PLoS ONE* レフェリー有 8(10): Article No.e77710, 2013.
- *62. Hirahara Y, Matsuda KI, Yamada H, Saitou A, Morisaki S, Takanami K, Boggs JM, Kawata M. G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Glia* レフェリー有 61(3):420-431 2013

(解剖学第二)

63. Trifonov S, Yamashita Y, Kase M, Maruyama M, Sugimoto T. Overview and assessment of the histochemical methods and reagents for the detection of β -galactosidase activity in transgenic animals. *Anatomical Science International*. レフェリー有 91 (1):56-67.2016
64. Trifonov S, Yamashita Y, Kase M, Maruyama M, Sugimoto T. Glutamic acid decarboxylase 1 alternative splicing isoforms: characterization, expression and quantification in the mouse brain. *BMC Neuroscience*. レフェリー有 15(1):Article No. 114.2014
- *65. Maruyama M, Yamashita Y, Kase M, Trifonov S, Sugimoto T. Lineage-Specific Purification of Neural Stem/Progenitor Cells From Differentiated Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*. レフェリー有 2 (6):420-433.2013
66. Trifonov S, Houtani T, Kase M, Toida K, Maruyama M, Yamashita Y, Shimizu J, Sugimoto T. Lateral regions of the rodent striatum reveal elevated glutamate decarboxylase 1 mRNA expression in medium-sized projection neurons. *Eur. J. Neurosci*. レフェリー有 35(5):711-722.2012
67. Horie A, Fujiwara H, Sato Y, Suginami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I, Hattori A. Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. *Human Reproduction*. レフェリー有 27 (5):1267-1276.2012

(生理学第二)

68. Balasubraman P, Chakravarthy S, Wong-Lin K, Wang D, Cohen J Y, Nakamura K, and Moustafa A, Neural circuit models of serotonergic system: From microcircuits to cognition. In A. Moustafa (Ed.) Computational models of Brain and Behavior. Wiley-Blackwell. In press. 2017
69. Wong-Lin K, Wang D, Moustafa A, Cohen J. and Nakamura K, "Toward a multiscale modeling framework for understanding serotonergic function" in its current form for publication in the Journal of Psychopharmacology. In press 2017
70. Yamada H, Inokawa H, Hori Y, Pan X, Matsuzaki R, Nakamura K, Samejima K, Shidara M, Kimura M, Sakagami M, Minamimoto T, Characteristics of fast-spiking neurons in the striatum of behaving monkeys. *Neurosci Res.* 105:2-18. 2016
71. 中村加枝 林和子 中尾和子 背側縫線核による報酬・嫌悪情報処理 日本薬理学雑誌 vol149 2017

(生物学)

72. Schoch H, Kreibich AS, Ferri SL, White RS, Bohorquez D, Banerjee A, Port RG, Dow HC, Cordero L, Pallathra AA, Kim H, Li H, Bilker WB, Hirano S, Schultz RT, Borgmann-Winter K, Hahn CG, Feldmeyer D, Carlson GC, Abel T, Brodtkin ES. Sociability Deficits and Altered Amygdala Circuits in Mice Lacking Pcdh10, an Autism Associated Gene. *Biol Psychiatry.* レフェリー有 81(3):193-202. 2017

(公衆衛生学)

73. 王 澤蘊、神田靖士、下埜敬紀、ヴィエンバリー フォンマニーボン、西山利正、ラット下垂体腫瘍細胞 MtT/Se を用いた漢方製剤のエストロゲン様作用の検討、産婦人科 漢方研究のあゆみ、レフェリー有 33:36～39.2016.4
74. Hosomi R, Otsuka R, Arai H, Kanda S, Nishiyama T, Yoshida M, Fukunaga K. Porcine Hemoglobin Promotes Lipid Excretion to Feces more Strongly than Globin Protein in Rats. *Food Sci. Biotechnol.* レフェリー有. 25(S): 107-112, 2016
75. Fukunaga K, Hosomi R, Fukao M, Miyauchi K, Kanda S, Nishiyama T, Yoshida M. Hypolipidemic Effects of Phospholipids

(PL) Containing n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Are Not Dependent on Esterification of n-3 PUFA to PL. *Lipids*. レフェリー有. 51:279-289 January 2016

76. Ooka H, Kanda S, Okazaki H, Suzuki H, Mishima K, Saito I, Yagi M, Tomoda K, Nishiyama T, Characterization of side population (SP) cells in murine cochlear nucleus. *Acta Otolaryngol*. レフェリー有. 132(7):693-701, 2012.7.
77. Osumi Y, Shibata SB, Kanda S, Yagi M, Ooka H, Shimano T, Asako M, Kawamoto K, Kuriyama H, Inoue T, Nishiyama T, Yamashita T, Tomoda K, Characterization of side population (SP) cells in murine cochlear nucleus. *Brain Res*. レフェリー有. 1454:23-32, 2012.5

(外科学)

- *78. Kim S, Toyokawa H, Yamao J, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Yamaki S, Inoue K, Matsui Y, Kwon AH. Antitumor Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Losartan for Orthotopic Rat Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas*. レフェリー有・43(6): 886-890. 2014
- *79. Yamao J, Toyokawa H, Kim S, Yamaki S, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Matsui Y, Kwon AH. Activation of alpha-smooth muscle actin-positive myofibroblast-like cells after chemotherapy with gemcitabine in a rat orthotopic pancreatic cancer model. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. レフェリー有・20(2): 206-213. 2013

(形成外科学)

80. Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Hihara M, Notodihardjo PV, Matsui M, Tabata Y, Kusumoto K, Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected into murine subcutis. *J Tissue Eng Regen Med*. レフェリー有 Epub ahead of print.2016
- *81. Hara T, Kakudo N, Morimoto N, Horio O, Ogura T, Kusumoto K, Effect of aging on the osteoinductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rats. *J Surg Res* レフリー有 195(1):377-383,2015.
- *82. Notodihardjo PV, Morimoto N, Kakudo N, Matsui M, Sakamoto

M, Liem PH, Suzuki K, Tabata Y, Kusumoto K, Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model. *J Artif Organs* レフリー有 18(1):64-71,2015.

- *83. Kakudo N, Morimoto N, Kushida S, Ogawa T, Kusumoto K, Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo. *Med. mol. morphol.* レフェリー有 47(2):83-89.2014
- *84. Notodiharjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K, Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. *J Cranio-Maxillofac Surg* レフリー有 40(3):287-291,2012.

(眼科学)

85. Shmueli RB1, Ohnaka M, Miki A, Pandey NB, Lima e Silva R, Koskimaki JE, Kim J, Popel AS, Campochiaro PA, Green JJ: Long-term suppression of ocular neovascularization by intraocular injection of biodegradable polymeric particles containing a serpin-derived peptide. *Biomaterials* レフェリー有 34(30):7544-51. 2013
86. Ohnaka M, Miki K, Gong YY, Stevens R, Iwase T, Hackett SF, Campochiaro PA: Long-term expression of glial cell line-derived neurotrophic factor slows, but does not stop retinal degeneration in a model of retinitis pigmentosa. *J Neurochem* レフェリー有 122(5):1047-53. 2012

(整形外科)

- *87. Nakamura T, Kushida T, Okamoto N, Oe K, Ikeura A, Li M, Ikehara S, Iida H. Induction of autoimmune arthritis after direct injection of bone marrow cells from arthritis-prone SKG/Jcl mice into bone cavity of normal mice: Bulletins of the Pharmaceutical Society. *Biol Pharm Bull.* 37(11):1719-26, 2014.

(救急医学)

88. Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, Suzuki Y, Nakatani T, Fukushima M, Hayashibe M, Ide C, Effects of Bone Marrow Stromal Cell Transplantation through CSF on the Subacute and Chronic Spinal Cord Injury in Rats. *PLoS ONE* レフ

エリー有 8(9):2013 年 e73494. doi:10.1371

89. Suzuki Y, Ishikawa N, Omae K, Hirai T, Ohnishi K, Nishida H, Tamura K, Nakano N, Nakatani T, Masanori Fukushima, and Chizuka Ide: Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation in spinal cord injury patients by lumbar puncture. *Restor Neurol Neurosci*. レフェリー有 32:473-482,2014

(神経内科学)

- *90. Oki M, Kaneko S, Morise S, Takenouchi N, Hashizume H, Tsuge A, Nakamura M, Wate R, Kusaka H, Zonisamide ameliorates levodopa-induced dyskinesia and reduces expression of striatal genes in Parkinson model rats *Neurosci Res* レフェリー有(2017, in press)
91. Nakamura S, Wate R, Kaneko S, Ito H, Oki M, Tsuge A, Nagashima M, Asayama S, Fujita K, Nakamura M, Maruyama H, Kawakami H, Kusaka H. An autopsy case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the I113T SOD1 mutation. *Neuropathology* レフェリー有 34(1):58-63 2014
92. Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Jiang S, Fujita K, Wate R, Nakano S, Fujisawa JI, Kusaka H. Activation of Transforming Growth Factor- β /Smad Signaling Reduces Aggregate Formation of Mislocalized TAR DNA-Binding Protein-43. *Neurodegener.Dis.* レフェリー有 11(4):182-193 2013
93. Nakamura M, Kaneko S, Wate R, Asayama S, Nakamura Y, Fujita K, Ito H, Kusaka H. Regionally different immunoreactivity for Smurf2 and pSmad2/3 in TDP-43-positive inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. レフェリー有 39(2):144-156 2013
94. Neumann M, Valori CF, Ansorge O, Kretschmar HA, Munoz DG, Kusaka H, Yokota O, Ishihara K, Ang LC, Bilbao JM, Mackenzie IR. Transportin 1 accumulates specifically with FET proteins but no other transportin cargos in FTLD-FUS and is absent in FUS inclusions in ALS with FUS mutations. *Acta neuropathol*. レフェリー有 124(5):705-716 2012

IV. 疾患モデル動物

疾患モデル名 (疾患名)	水晶体脱臼
代表研究者 所属・氏名	薬理学講座・中邨智之
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	弾性線維、細胞外マトリックス
動物種	マウス
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	遺伝子改変 (Ltbp2 ノックアウト)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	ヒトで先天性緑内障や遺伝性水晶体脱臼の原因として LTBP2 上の変異が報告されている。本マウスはヒトの LTBP2 のオーソログである Ltbp2 を欠損しており、水晶体脱臼の表現型を呈する。また DBA2/J マウスにおいては老年齢で眼圧の上昇を認める。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, Horiguchi M, Kameyama K, Hata Y, Takahashi K, Kusumoto K, Nakamura T, Latent TGFβ binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils. Hum Mol Genet. 23(21):5672-82. 2014.
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	皮膚弛緩症 (Autosomal Recessive Cutis Laxa Type 1C (ARCL1C), Urban-Rifkin-Davis Syndrome (URDS))
代表研究者 所属・氏名	薬理学講座・中邨智之
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	弾性線維、細胞外マトリックス
動物種	マウス
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	遺伝子改変 (Ltbp4 ノックアウト)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	ヒトで ARCL1C の原因として LTBP4 上の変異が報告されている。本マウスはヒトの LTBP4 のオースログである Ltbp4 を欠損しており、肺気腫の表現型を呈する。また新生仔において大動脈の蛇行を認める。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Noda K, Dabovic B, Takagi K, Inoue T, Horiguchi M, Hirai M, Fujikawa Y, Akama TO, Kusumoto K, Zilberberg L, Sakai LY, Koli K, Naitoh M, von Melchner H, Suzuki S, Rifkin DB, Nakamura T, Latent TGFβ binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110(8):2852-7, 2013.
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	該当せず
代表研究者 所属・氏名	薬理学講座・中邨智之
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	弾性線維、細胞外マトリックス
動物種	マウス
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	遺伝子改変 (ROSA26-Ltp4 ノックイン)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	弾性線維形成に関係する細胞外マトリックスタンパク質 Ltp4 を全身で発現している。Ltp2 ノックアウトの表現型 (水晶体脱臼) を補償することができる。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Fujikawa Y, Yoshida H, Inoue T, Ohbayashi T, Noda K, von Melchner H, Iwasaka T, Shiojima I, Akama TO, Nakamura T, Latent TGF- β binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development. Sci. Rep. 7:43714, 2017.
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	リンパ増殖性自己免疫疾患
代表研究者 所属・氏名	分子遺伝学部門 木梨達雄
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	免疫
動物種	マウス
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	RAPL (Rassf5c) 遺伝子欠損
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	Rap1 結合蛋白質 RAPL 欠損マウスは加齢 (6~8 カ月齢) とともに、脾臓、リンパ節の腫大、自己抗体産生、高免疫グロブリン値を示し、ループス腎炎のほか、肝臓、肺、腸管に炎症細胞浸潤が起こる。RAPL 欠損リンパ球は細胞周期チェックポイント分子である p27Kip1 の制御異常により細胞増殖が亢進していることがリンパ増殖性病態の原因である。肺がん、肝癌が 10%程度、生じる。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Katagiri K, Ueda Y, Tomiyama T, Yasuda K, Toda Y, Ikehara S, Nakayama KI, Kinashi T. 2011. Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27kip1. <i>Immunity</i> 34:24-38.
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	T 細胞性自己免疫疾患
代表研究者 所属・氏名	分子遺伝学部門 木梨達雄
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	免疫
動物種	マウス
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	Mst1 (Stk4)欠損マウス
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	Mst1 欠損マウス、LFA-1, VLA-4 を介する接着が低下し、若齢ではリンパ球ホーミング、胸腺移出低下によって末梢リンパ組織の低形成を示す。加齢 (6~8 カ月齢) とともに活性化リンパ球の増加、自己抗体産生、多臓器への炎症細胞浸潤を呈する。Mst1 欠損によって LFA-1 を介する接着低下、免疫シナプス形成障害が起こり、胸腺細胞の負の選択異常、制御性 T 細胞の抑制機能低下がおこる。T-bet を介するエフェクター分子 (IFN γ , granzyme) の産生亢進によって細胞障害性 T 細胞の機能亢進がおこり、自己免疫病態に陥る。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Katagiri K, Katakai T, Ebisuno Y, Ueda Y, Okada T, Kinashi T. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. <i>EMBO J</i> 28:1319-1331. 2009. 2. Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T, Ikehara S, Matsumoto M, Kinashi T, Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen-recognition in the thymus. <i>Nat. Commun.</i> 3:1098. 2012 3. Tomiyama T, Ueda Y, Katakai T, Kondo N, Okazaki K, Kinashi T. Antigen-specific suppression and immunological synapse formation by regulatory T cells require the mst1 kinase. <i>PLoS One.</i> 8(9):e73874, 2013. 4. Yasuda K, Ueda Y, Ozawa M, Matsuda T, Kinashi T, Enhanced cytotoxic T cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency. <i>FEBS Letter</i> 590(1):68-75. 2016. 5. Kondo N, Ueda Y, Kita T, Ozawa M, Tomiyama T, Yasuda K, Lim DS, Kinashi T. NDR1-dependent regulation of kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. <i>Mol Cell Biol.</i> 2017 37 : e00424-16
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	T細胞接着不全症 (白血球接着不全症)
代表研究者 所属・氏名	分子遺伝学部門 木梨達雄
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	免疫
動物種	マウス
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	Rap1a/Rap1b 遺伝子欠損マウス (T細胞系列特異的欠損マウス)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	Rap1 は β 1, β 2, β 3インテグリンの活性化シグナル分子である。Rap1a と Rap1b の2つの遺伝子があり、機能的代償性を持つ。ダブルノックアウトマウスは胎生致死になる。T細胞系列欠損では β 1, β 2 インテグリンを介する接着異常により、リンパ球ホーミング、免疫シナプスが障害される。末梢リンパ節のナイーブ T細胞数が著しく低下する。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Kondo N, Ueda Y, Kita T, Ozawa M, Tomiyama T, Yasuda K, Lim DS, Kinashi T. NDR1-dependent regulation of kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. <i>Mol Cell Biol.</i> 2017 37 : e00424-16 2. Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. <i>J Immunol.</i> レフェリー有 196(7):3019-31.2016
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	IgG4 関連疾患動物モデル
代表研究者 所属・氏名	内科学第三講座・岡崎和一
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	消化器免疫
動物種	マウス
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	poly:IC を MRL/mp マウス、新生時期胸腺摘除マウスに投与、あるいは Mst ノックアウトマウスを使用して、自己免疫性膵炎類似病変を作成した。
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	本研究ではわが国より発信された難治性疾患である IgG4 関連疾患の膵病変である自己免疫性膵炎の発症機序を明らかにすることを目的に、自己免疫性膵炎モデルマウスを開発作成し、末梢血、膵・胆管・肝組織を用いて、免疫・分子生物学的解析を行った。更にステロイドや免疫抑制剤以外に膵炎発症時の小胞体ストレスとその軽減による膵炎治療効果について検討し、新規治療法の開発を行った。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fukuhara T, <u>Tomiyama T</u>, Yasuda K, Ueda Y, Ozaki Y, Son Y, Nomura S, <u>Uchida K</u>, <u>Okazaki K</u>, Kinashi T. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. レフェリー有 Biochem Biophys Res Commun. 2015;463(4):968-74. 2. Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, <u>Uchida K</u>, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, <u>Okazaki K</u>, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN-α Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. J Immunol. レフェリー有 2015;195(7):3033-44 3. <u>Sakao M</u>, Sakaguchi Y, Suzuki R, Takahashi Y, Kishimoto M, <u>Fukui T</u>, <u>Uchida K</u>, <u>Nishio A</u>, Matsuzaki K, <u>Okazaki K</u>. Smad2/3 Linker Phosphorylation Is a Possible Marker of Pancreatic Stem/Progenitor Cells in the Regenerative Phase of Acute Pancreatitis. Pancreas. レフェリー有 2017;46:605-613. <p>学会発表</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>K Uchida</u>, <u>Y Fukui</u>, T Mitsuyama, H Miyoshi, T Ikeura, M Shimatani, <u>T Fukui</u>, M Matsushita, M Takaoka, <u>A Nishio</u>, <u>K</u>

	<p><u>Okazaki</u>. The Pathophysiological Role of Toll-like Receptor Signaling in Type 1 Autoimmune Pancreatitis. Asian Pasific Digestive Week 2015. 12</p> <p>2. The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 1 Autoimmune Pancreatitis. K Uchida, Y Fukui, M Yanagawa, T Mitsuyama, K Sumimoto, T Ikeura, Y Sakaguchi, M Shimatani, T Fukui, M Matsushita, M Takaoka, A Nishio, S Satoi, AH Kwon, K Okazaki. 45th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreatic Society. 2014.11</p>
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	自己免疫性消化器疾患動物モデル (潰瘍性大腸炎および関連癌)
代表研究者 所属・氏名	内科学第三講座・岡崎和一
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	消化器免疫
動物種	マウス
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	DSS とアゾキシメタンを野生マウス、IL-10 ノックアウトマウス、に投与して潰瘍性大腸炎と関連大腸がん類似病変を作成した。
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	ヒトの炎症性腸疾患発癌モデルと考えられる、大腸癌モデルマウスを作成し、我々の開発した消化管幹細胞マーカーであるリンカー部スレオニンリン酸化 Smad2, 3 蛋白 (pSmad2/3L-Thr) に対する抗体を用いて、腫瘍幹細胞としての可能性や発癌メカニズムについて解析した。更に実験的大腸炎モデルを用いて小胞体ストレスとその軽減による腸炎治療効果について検討し、新規治療法の開発を行った。

<p>文献（あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。）</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Okazaki T, Nishio A, Takeo M, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Okazaki K.</u> Inhibition of the Dephosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2α Ameliorates Murine Experimental Colitis. <i>Digestion</i>. レフェリー有 2014;90(3):167-178 2. Suzuki R, <u>Fukui T</u>, Kishimoto M, Miyamoto S, Takahashi Y, <u>Takeo M</u>, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, <u>Uchida K, Nishio A, Okazaki K.</u> Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. <i>J Crohns Colitis</i>. レフェリー有 2015;9:565-74 3. <u>Toyonaga T</u>, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Yoshino T, Honzawa Y, Ito A, Namba K, Minami N, Yamada S, Koshikawa Y, Uede T, Chiba T, <u>Okazaki K.</u> Osteopontin Deficiency Accelerates Spontaneous Colitis in Mice with Disrupted Gut Microbiota and Macrophage Phagocytic Activity. <i>PLoS One</i>. レフェリー有 2015 Aug 14;10(8):e0135552. doi: 10.1371/journal.pone.0135552. <p>学会発表</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Toshiro Fukui</u>, Ryo Suzuki, Masanobu Kishimoto, Yu Takahashi, <u>Sachi Miyamoto, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki</u> Carcinogenic and stem cell-like phenotypes of Smad2/3 linker phosphorylation in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. APDW (Asian Pacific Digestive Week) 2015 Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan. 2015. 12 2. <u>福井寿朗</u> 岸本真房 高橋悠 鈴木亮 宮本早知 谷村雄志 松本泰司 中島淳 坂尾将幸 内田一茂 西尾彰功 岡崎和一 腸炎関連大腸癌モデルマウスにおける Smad2/3 蛋白リンカー一部リン酸化の発癌との関連性についての検討 第7回日本炎症性腸疾患学会 2016/7/8-9 (国立京都国際会館)
<p>備考</p>	

疾患モデル名 (疾患名)	成人 T 細胞白血病 (ATL)
代表研究者 所属・氏名	微生物学講座・藤澤順一
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	感染、癌
動物種	マウス
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	<p>ヒト化マウスの作成: 重症免疫不全 NOG あるいは NSG マウスに放射線照射後、ヒト臍帯血より分離・精製した CD133 陽性造血幹細胞を骨髄内に注入し 4-6 ヶ月飼育する。</p> <p>ヒト化マウスへの HTLV-1 感染: ヒト化マウス末梢血に CD45 陽性ヒト白血球が発現することを確認後、放射線照射により増殖を欠失させた HTLV-1 感染 T 細胞株を腹腔内あるいは経口で投与し HTLV-1 を感染させる。</p>
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	<p>HTLV-1 感染ヒト化マウスにおいては、感染数週間後から末梢血中の HTLV-1 感染 CD4 陽性 T 細胞の異常増殖が観察され、通常、2 ヶ月以内に ATL に特徴的な花弁様分様核をもつ細胞の出現を伴い、CD25 陽性 CD4 T 細胞が $>10,000/\mu\text{L}$ となり白血病死する。AZT, IFN-α 等の投与により感染細胞の増殖が抑制される。</p> <p>Tax ペプチドワクチンの投与により、感染予防/感染細胞増殖抑制効果が得られる。</p>
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Takaharu Ueno, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi and Jun-ichi Fujisawa: An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. Blood 123, 346-355, 2014
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	免疫不全
代表研究者 所属・氏名	生体情報部門・松田達志
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	免疫、代謝
動物種	マウス
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	遺伝子改変 (Raptor-flox x mb1-Cre)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	末梢血におけるイムノグロブリン低値を示し CVID のモデルマウスとして利用可能。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Ohtani, M., Fujii, H., Ohara, O., Koyasu, S., Kubo, M., <u>Matsuda, S.</u> B-lineage specific loss of mTORC1 signal causes selective production of IgA against commensal bacteria. The 43 th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kyoto. 2014. 12.
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	多発性嚢胞腎
代表研究者 所属・氏名	生体情報部門・松田達志
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	免疫、代謝
動物種	マウス
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	遺伝子改変 (conditional Tsc1 欠損)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	尿細管上皮細胞における mTORC1 シグナルの亢進により、9 週齢以降 100% の頻度で腎嚢胞を発症。遺伝子改変による mTORC1 シグナル消失によって腎嚢胞発症が完全に抑えられたことから、腎嚢胞の治療モデルとしても利用可能と思われる。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	未発表
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	恐怖症、強迫性障害、不安障害、PTSD、うつ病
代表研究者 所属・氏名	神経機能・小早川令子
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	神経
動物種	マウス
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	遺伝子改変 (Htr2A-Cre マウス)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	本研究により扁桃体中心核のセロトニン2A受容体 (Htr2A) の活性が、後天的恐怖を緩和するのに対して、先天的恐怖を増悪するという、恐怖情動の拮抗的かつ階層的統合因子としての機能が解明された。Htr2A-Cre マウスを用いて、様々な精神疾患モデルに於ける CeA-Htr2A 細胞の神経活動と異常行動との相関関係を解明することで、リスペリドンなどの Htr2A 拮抗薬を処方すべき精神疾患を特定できる。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Isosaka T, Matsuo T, Yamaguchi T, Funabiki K, Nakanishi S, Kobayakawa R*, Kobayakawa K*. Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy between innate and learned fear. (* corresponding authors) <i>Cell</i> 163, 1153-1164. 2015
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	マウス中大脳動脈閉塞 (MACO) モデル (脳梗塞)
代表研究者 所属・氏名	解剖学第一講座・山田久夫
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	神経、代謝
動物種	CB17/Icr- +/+Jcl
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	麻酔下にて、CB17/Icr- +/+Jcl マウス側頭部の皮膚を切開し顎関節を脱臼させ、側頭骨に小孔をあけ、中大脳動脈を同定しバイポーラコアギューレータにより焼灼・切断する。皮膚を縫合し麻酔から覚醒させ飼育する。術後 24 時間で終脳皮質に局限した梗塞巣を形成し、その後安定した長期飼育が可能である。
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	本モデルは中大脳動脈の永久梗塞モデルであり、脳梗塞発症後の脳機能改善を目的とした研究に有用である。他系統のマウスでも同様の術式で梗塞形成は可能であるが、この系統を用いる事で皮質における梗塞巣サイズ、線条体での梗塞の有無等において個体間でのばらつきを抑える事が出来る。さらに運動障害を呈しないモデルであるため長期飼育が可能であり (術後約 5 週間) 脳梗塞の急性期から慢性期までのモデルとして使用できる。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Bile acid synthesis in acute stage cerebral ischemia. Saori Wada, Souichi Oe, Yukie Hirahara, Akira Saitou, Hisao Yamada 第 40 回日本神経科学大会 (2017 年 7 月) にて学会発表予定
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	クプリゾン誘発性脱髄疾患モデル
代表研究者 所属・氏名	解剖学第一講座・山田久夫
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	神経、代謝
動物種	Wistar rat
疾患モデル作出法:遺伝子改変(遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	銅キレート剤クプリゾンを経口投与2週間、混餌投与2週間し、脳梁部位に脱髄を誘発させ、通常食に戻すことにより再ミエリン化を誘導できる。
病態(疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	多発性硬化症の一つの動物モデルとしてクプリゾン誘発脱髄モデルが使用される。これは、自己免疫を活性化しないモデルで、オリゴデンドロサイトへ直接的にダメージを与え、脱髄を誘発する。給餌によるコントロール下で、急性的に脱髄を起こした後に再ミエリン化の仕組みを解析することが可能である。脱髄後の急速な再ミエリン化の誘導が症状の悪化を防ぐ最も効果的なツールと考えられ、これらの検索には、このモデルが適している。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. <i>Glia</i> 2013 61:420-431
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	硫酸化糖脂質欠損マウス (精子形成不全・ミエリン形成不全)
代表研究者 所属・氏名	解剖学第一講座・山田久夫
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	神経、代謝
動物種	C57BL/6
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	遺伝子改変； TgH(CSTneo)
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	硫酸化糖脂質は、多くの臓器に発現し、その発現量の変化は、アルツハイマーやパーキンソン等の神経障害、がんの浸潤、糖尿病、ウイルス感染とも関わっていることがわかっている。この合成酵素、糖脂質硫酸転移酵素 CST 欠損マウスの表現型は、硫酸化糖脂質含有量の多い組織、ミエリン鞘と精巣上皮に顕著に現れる。他の組織でも多くの疾患が考えられ、硫酸化糖脂質の生理学的機能を知るには有用であると考えられる。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	<ul style="list-style-type: none"> ● Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: Development in sulfatide-null mice. <i>Glia</i> 2004 45 (3): 269-77. ● Cerebroside sulfotransferase deficiency ameliorates L-selectin-dependent monocyte infiltration in the kidney after ureteral obstruction. <i>J Biol Chem.</i> 2004 279 (3): 2085-90. ● A myelin galactolipid, Sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation. <i>J. Neurosci.</i> 2002 ● Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2002 99(7): 4227-32 ● cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase. <i>Eur J Biochem</i> 2000 267(7): 1909-17
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	うつ病等の情動障害モデル
代表研究者 所属・氏名	生理学第二講座 中村加枝
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	神経
動物種	サル (カニクイザル)
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	①サル(カニクイザル、オス 6kg)の背側縫線核の位置を、MRI 画像及び電気生理学的に同定する。 ②①で位置を確認した背側縫線核に、金属電極を装着した微細な金属チューブを神経活動を記録しながら刺入し、ウイルスベクターを注入する。ウイルスベクターとしては、サル TPH2 遺伝子上流配列の下流で ChR2 遺伝子 (クラミドモナス由来) および eYFP 遺伝子 (オワンクラゲ由来) を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (ヘルパーウイルスフリーで作製したものであり、Cap、Rep 遺伝子を欠損するため自立増殖能を有さない) を用いた。
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	セロトニンは精神神経疾患の治療薬にもその作用薬が多く、情動や意思決定などに影響を及ぼす神経メカニズムの同定は重要である。脳幹の背側縫線核にはセロトニン細胞が多く存在するが、GABA、ドパミン、ノルアドレナリン細胞なども存在するため、セロトニン固有の機能と結びつけることが困難である。さらに、背側縫線核のセロトニン細胞のみを選択して興奮・抑制をして行動の変化を計測し、その機能を明らかにするという因果関係を明らかにすることも重要であるが、セロトニン受容体は非特異的に様々な細胞に分布しているため細胞種・回路特異的な興奮・抑制は望めない。昨今、げっ歯類ではウイルスベクターを用いて細胞に選択的に DREADD やチャンネルロドプシンを発現させ、セロトニン細胞のみを選択的に機能促進・抑制する方法が一般的になってきた。しかし、霊長類においては適切なウイルスベクターは開発されていない。ヒトの病態解明や治療を目指すためには、脳構造が似ている霊長類の検討が欠かせない。 本研究では京都大学薬理学講座 永安一樹博士の作成したウイルスベクターを、一頭のサル背側縫線核に接種し、その発現効率や拡散の程度を確認した。その結果、注入部位および投射部位において光刺激にも十分反応することが明らかになった。今後この modulation により脳全体としてどのような活動変化さらには機能の変化が起きるかを明らかにしていく。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	現在論文準備中のため未発表
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	Pcdh9(Puro-loxP-Neo) (自閉症)
代表研究者 所属・氏名	生物学教室・平野伸二
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	神経
動物種	マウス
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	Pcdh9 のエキソン 1 を lox P で挟んだ遺伝子改変
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	Pcdh9 はヒトの自閉症関連遺伝子であることが報告されている。我々の研究によりそのノックアウトマウスには情動系の行動異常が見られることがわかっているが、本マウスはコンディショナルノックアウトマウスを作製するためのものである。Pcdh9 による自閉症発症の分子機構の解明の研究に利用が期待されている。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	未発表
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	ラット正所性膵臓腫瘍モデル
代表研究者 所属・氏名	外科学講座・権 雅憲
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	癌
動物種	ラット
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	ラットの膵腺癌細胞株である DSL-6A/C1 細胞を用いて膵癌モデルを作成した。
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	ラット正所性膵臓腫瘍モデルの作成、膵線維化活性抑制と抗腫瘍効果の検討: GEM 治療群の膵癌組織中の α -SMA の発現は有意に減少しさらに VEGF の発現は有意に減少した。 これらの結果は、GEM は腫瘍増殖を抑制するばかりでなく、VEGF 発現を減少させる事で膵星細胞の抑制を強いていると考えられた。 ラット正所性膵臓腫瘍モデルにおける各種薬剤の抗腫瘍効果の検討: GEM および LOS 投与群では、コントロール群と比較して、膵癌組織での VEGF 発現が有意に抑制された。以上の結果から GEM と LOS の併用は、アンギオテンシン I を介した VEGF 合成を阻害し細胞増殖を抑制する事によって、ラット膵癌の生存期間を有意に改善したと考えられた。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	<ul style="list-style-type: none"> ● Yamao J, Toyokawa H, Kim S, Yamaki S, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Matsui Y, Kwon AH. Activation of alpha-smooth muscle actin-positive myofibroblast-like cells after chemotherapy with gemcitabine in a rat orthotopic pancreatic cancer model. J Hepatobiliary Pancreat Sci. レフェリー有・20(2)・2013・206-213 ● Kim S, Toyokawa H, Yamao J, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Yamaki S, Inoue K, Matsui Y, Kwon AH. Antitumor Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Losartan for Orthotopic Rat Pancreatic Adenocarcinoma. Pancreas レフェリー有・43(6)・2014・886-890
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	難治性皮膚潰瘍治癒モデル
代表研究者 所属・氏名	形成外科学 楠本健司
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	創傷治癒、再生医療
動物種	Wistar ラット
疾患モデル作出法: 遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	ラット背部に規格化した皮膚欠損層を作成した。
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	規格化した皮膚欠損を作成したが、自然治癒群をコントロールとし、他の条件設定による創傷治癒の比較検討を行うことが出来る。癒痕拘縮の影響を避けるため、欠損創周囲にプラスチックリングを逢着し、より純粋な創傷治癒を観察できることを目指している。ヒトで多い慢性潰瘍での前臨床の有効な治療法を示唆している。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model. Notodihardjo PV, Morimoto N, Kakudo N, Matsui M, Sakamoto M, Liem PH, Suzuki K, Tabata Y, Kusumoto K.J Artif Organs. 18(1):64-71,2015.
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	骨再生モデル
代表研究者 所属・氏名	形成外科学 楠本健司
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	創傷治癒、再生医療
動物種	Wistar ラット
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	ラット腓腹筋内に規格化した空隙を作成した。
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	腓腹筋肉の空隙内に rhBMP その他、比較検討する材料を埋入して、異所性の骨誘導を検討した。X線画像、骨密度、組織標本、カルシウム値などでの比較検討を行い、若齢ラットでは老齢ラットの比較して有意に骨の誘導の所見が得られた。これは、今後の高齢社会での骨治癒への rhBMP の寄与の基盤となるデータである。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	Effect of aging on the osteoinductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rats. Hara T, Kakudo N, Morimoto N, Horio O, Ogura T, Kusumoto K. J Surg Res. 195(1):377-83,2015.
備考	

疾患モデル名 (疾患名)	レーザー誘発脈絡膜新生血管 (血管新生黄斑症)
代表研究者 所属・氏名	眼科学講座 高橋寛二
関連分野 (神経、免疫、癌、代謝、など)	感覚器
動物種	マウス、ラット
疾患モデル作出法：遺伝子改変 (遺伝子変異名を記載)、感染、移植、薬剤、放射線など	実験動物の眼底に強度レーザー光凝固を行うことにより脈絡膜新生血管を誘発
病態 (疾患モデルとしての有用性、治療への貢献など)	光干渉断層計血管造影による脈絡膜新生血管の診断基準の確立、各種治療薬による脈絡膜新生血管の治療効果確認などに有用性が高い。
文献 (あるいは学会発表。未発表の場合、その旨記載する。)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mori H, Yamada H, Takahashi K, Akama T, Nakamura T: Changes in immunostaining of five elastic fiber Component in Bruch's membrane and laser-induced choroidal neovascularization. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016 Annual meeting, Seattle , USA, 2016/5/1~5 2. Nakagawa K, Yamada H, Takahashi K: Imaging of laser-induced choroidal neovascularization in mice using optical coherence tomography angiography. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017 Annual meetin, Baltimore , USA, 2017/5/1~5
備考	

**資料：研究プロジェクト各事業推進者
研究成果報告書概要集**

研究成果報告書の概要

講座等名	薬理学講座	事業推進	中邨智之
分担研究課題	弾性線維再生機構の破綻による難治性疾患モデル開発		
キーワード	細胞外マトリックス、老化		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	6 名		
<p>研究組織(本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等)</p> <p>中邨智之(教授):研究の統括 赤間智也(准教授):遺伝子改変モデルマウス作成 大谷ひとみ(講師):遺伝子改変モデルマウス解析 北川香織(助教):遺伝子改変モデルマウスの維持と解析 中山靖久(助教):遺伝子改変モデルマウスの作成 吉田秀之(大学院生):遺伝子改変モデルマウスの解析</p>			
<p>研究成果の概要(平成 24~28 年度の研究成果について)</p> <p>組織の伸縮性を担うのは弾性線維という細胞外マトリックスであり、その劣化・分解が皮膚のたるみだけでなく肺気腫や動脈中膜硬化の直接原因となる。本研究では新たな細胞外マトリックス分子の遺伝子改変マウス作成を行い、新規疾患モデルを開発すること、またこれら細胞外マトリックス分子の生体内での役割を明らかにすることを目的とした。</p> <p>LTBP-4 という細胞外マトリックスタンパク質の遺伝子欠損マウスの解析を行い、弾性線維形成不全のため肺気腫や動脈の硬化と蛇行などヒト老化に類似した表現型を示すこと、我々が以前作成した Fibulin-5 の遺伝子欠損マウスによく似ていることを見いだした。細胞培養とリコンビナントタンパク質を用いて LTBP-4 の弾性線維形成における作用機序を研究し、LTBP-4 が Fibulin-5 と結合し Fibulin-5-エラスチン複合体をマイクロフィブリル上に沈着させるための足場となることを明らかにした(Noda K et al, <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 110:2852-7, 2013)。</p> <p>LTBP-2 という細胞外マトリックスタンパク質の遺伝子変異が複数の先天性緑内障患者で報告された。これらの患者は眼圧が上昇するのに加えて水晶体脱臼を伴うのが特徴で、眼圧上昇の程度は症例によって大きく異なっている。我々は <i>Ltbp2</i> 遺伝子欠損マウスの作成と解析を行い、眼圧は上昇しないが水晶体脱臼はおこること、その原因が水晶体を支持する毛様小帯の形成不全によることを見いだした。毛様小帯はマイクロフィブリルという線維でできており、LTBP-2 はマイクロフィブリル線維束を形成するために必須の役割を持つことを明らかにした。また <i>LTBP2</i> 変異患者でみられる眼圧上昇は二次的なものであることが示唆された(Inoue T et al, <i>Hum Mol Genet</i>, 23:5672-82, 2014)。</p>			

LTBP-2 の遺伝子欠損が毛様小体でのみ表現型を示すことと LTBP-4 が毛様小体で発現していないことから、LTBP-2 と LTBP-4 は同じ機能を有し、毛様小体以外の組織では LTBP-4 が LTBP-2 欠損を補っているのではないかと予想した。これを確認するため、LTBP-2 と LTBP-4 の二重欠損マウスを作成しその表現型を調べたところ、二重欠損マウスは重度の肺気腫を発症し、約半数の二重欠損マウスが生後 1 ヶ月以内に死亡した。また、LTBP-2 欠損マウスの毛様小体に LTBP-4 を強制発現させたところ、LTBP-2 欠損マウスに見られた水晶体脱臼の表現型が改善され、毛様小体形成が回復した。これらの結果から LTBP-2 と LTBP-4 は共に成熟したマイクロフィブリル線維束の形成に必要であることが証明された(Fujikawa, Y. et al., *Sci. Rep.*, 7:43714-27, 2017)。

優れた成果があがった点

これまでマイクロフィブリルはその主成分であるフィブリリン 1,2 だけで構築されていると考えられてきたが、本研究により LTBP-2 および LTBP-4 がマイクロフィブリルの成熟過程に必須であることが明らかとなった。また LTBP-2 欠損により生じる水晶体脱臼に対し、LTBP-4 の過剰発現による治療の可能性を示した。本研究において作成した遺伝子変異マウスは肺気腫や水晶体脱臼などの疾患におけるモデルマウスとして利用できることがわかった。

問題点

遺伝子やタンパク質の生体内での生体内における機能を解析するには遺伝子変異マウスの作成が不可欠であるが、その作成には長い期間と熟練した技術が必要とする。CRISPR/Cas9 システムを用いた迅速な遺伝子変異マウス作成のプラットフォームを構築する必要があるのではなかろうか。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Fujikawa Y, Yoshida H, Inoue T, Ohbayashi T, Noda K, von Melchner H, Iwasaka T, Shiojima I, Akama TO, Nakamura T, Latent TGF- β binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development. *Sci. Rep.* レフェリー有 7:43714, 2017.
2. Kageshima M, Maruyama T, Akama T, Nakamura T, Novel magnetic indenter for rheological analysis of thin biological sheet for regenerative medicine. *Rev. Sci. Instrum.* レフェリー有 87:074302, 2016.
3. Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, Horiguchi M, Kameyama K, Hata Y, Takahashi K, Kusumoto K, Nakamura T, Latent TGF β binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils. *Hum Mol Genet.* レフェリー有 23(21):5672-82. 2014.
4. Noda K, Dabovic B, Takagi K, Inoue T, Horiguchi M, Hirai M, Fujikawa Y, Akama TO, Kusumoto K, Zilberberg L, Sakai LY, Koli K, Naitoh M, von Melchner H, Suzuki S, Rifkin DB, Nakamura T, Latent TGF β binding protein 4 promotes elastic fiber assembly by interacting with fibulin-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* レフェリー有 110(8):2852-7, 2013.

<図書>該当なし

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. Nakamura, T, Latent TGF β -binding protein 2 is essential for the stable structure of ciliary zonule microfibrils. XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. Tokyo. 2016. September.
2. 赤間智也、安形清彦、久保田智巳、中邨智之、福田道子, B. fragilis endo-beta-galactosidase のクローニングとその酵素活性解析. 第 89 回日本生化学会大会. 仙台. 2016 年 9 月
3. 中邨智之, 弾性線維は再生できるか ~ 線維形成の分子機構 ~. 太陽紫外線防御研究委員会 第 24 回シンポジウム. 大阪. 2014 年 3 月
4. 藤川雄介、赤間智也、井上唯史、中邨智之, Mutant LTBP-2 proteins lack secretion ability and fibrillin-1 binding activity. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸. 2013 年 12 月
5. Nakamura, T, TGFbeta-independent role of LTBPs in microfibril and elastic fiber assembly. Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber. Biddeford, U.S.A. 2013. July

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講座等名	分子遺伝学部門	事業推進	木梨達雄
分担研究課題	免疫細胞動態制御による免疫疾患モデルマウス開発と免疫疾患解析		
キーワード	Rap1, LFA-1, 免疫シナプス、自己免疫疾患		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			6 名
<p>研究組織(本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等)</p> <p>木梨達雄(教授):研究の統括 植田祥啓(講師):自己免疫疾患モデルの創出と解析 片貝智哉(講師):リンパ球動態解析 上岡裕治(講師):リンパ球動態解析 近藤直幸(助教):免疫シナプス解析 福原貫太郎(大学院生):自己免疫疾患モデル解析</p>			
<p>研究成果の概要(平成 24~28 年度の研究成果について)</p> <p>リンパ球はリンパ組織と血液を再循環しながら生体防御を行っており、細胞間および細胞外マトリックスとの接着を介する制御が重要な役割を果たしている。低分子量 G 蛋白質 Rap1 はインテグリン接着性を調節し、リンパ球動態に不可欠の制御因子であるが、Rap1 下流エフェクター分子 Mst1 の欠損マウスは加齢とともに自己免疫様病態を呈した。本プロジェクトではそのメカニズムと Rap1 シグナル制御を明らかにすることを目的とした。</p> <p>Mst1 キナーゼ欠損マウスは多臓器に炎症細胞浸潤および自己抗体産生が起こるが、この病態は T 細胞系列で欠損した場合で起こる。TCR トランジェニックマウスを用いて胸腺選択過程を解析した結果、胸腺細胞の選択異常が見出された。2 光子顕微鏡を用いた胸腺組織イメージングの手法を樹立し解析した結果、胸腺髄質に存在する成熟胸腺細胞の移動の低下がみられた。さらに負の選択過程を再現した胸腺組織イメージング手法を用いて解析した結果、Aire 陽性胸腺上皮細胞との抗原依存的接着(免疫シナプス)が負の選択過程で起こっており、Mst1 欠損で障害されていることが明らかになった (Ueda, Y, et. al. Nat Commun. 2012)。また、胸腺細胞の移動や免疫シナプス形成には Rap1 シグナルが必要であり、Semaphorin3e/PlexinD1 を介して負に制御されていることを明らかにした (Ueda, Y. et al. J. Immunol. 2016)。自己免疫病態を抑制する制御性 T 細胞(Treg)の機能を解析した結果、Mst1 欠損 Treg は抑制機能が障害されていることがマウス腸炎モデルを用いて明らかになった。Mst1 欠損 Treg は抗原特異的抑制機能が低下しており、樹状細胞との免疫シナプス形成が低下し、CD80/CD86 に対する down-regulation 作用が障害されていることが判明した (Tomiyama, T. et al, PlosOne 2013)。一方、Mst1 欠損細胞障害性 T 細胞の障害機能は亢進していることが明らかになった。Mst1 は FoxO1/3 を抑制することによって Tbet を介する IFNγ, granzyme の産生を抑制していた。その結果、Mst1 欠損ではこれらのエフェクター分子の発現が増加</p>			

し、抗腫瘍効果も増強していることが判明した(Yasuda, K. et. al. FEBS lett 2016)。ヒト自己免疫疾患 IgG4 関連疾患において Mst1 遺伝子プロモーターのメチル化が亢進し、Treg における Mst1 発現が有意に低下していたことが見出された(Fukuhara, K. BBRC 2015)。以上のことから Mst1 欠損マウスモデルが呈する自己免疫病態は胸腺選択の異常、制御性 T 細胞の抑制機能低下、細胞障害性 T 細胞の機能亢進が関与していることが示され、さらに Mst1 のエピジェネティック制御異常がヒト IgG4 関連疾患に関与する可能性が指摘された。Mst1 が LFA-1 の調節因子であることから分子・細胞レベルの解析を行った。二光子イメージングによって解析した結果、リンパ球はリンパ組織内で LFA-1/ICAM-1 依存性の高速な移動と非依存性の低速移動をしていること、前者はケモカインによる Rap1 シグナルおよび樹状細胞が関与し、後者は間葉系細胞が産生する autotaxin/LPA による Rho シグナルが関与していることを明らかにした (Katakai, T. J. Immunol. 2013, Katakai, T. 2014)。また免疫シナプスでは Rap1/RAPL/Mst1 によって活性化された NDR1 キナーゼがインテグリン制御蛋白質 kindlin-3 と会合し、その局在を調節することによって高親和性 LFA-1/ICAM-1 結合を誘導し、免疫シナプス形成に不可欠の働きをしていることを一分子イメージング等を用いて明らかにした(Kondo N. Mol Cell Biol 2017)

優れた成果があがった点

Mst1 欠損によっておこる自己免疫病態メカニズムをイメージング技術等を用いて免疫の場において明らかにできた。その分子・細胞レベルの詳細から Rap1 シグナルによるインテグリン調節が細胞移動・免疫シナプスに重要な働きをしており、生体防御だけでなく自己寛容の確立・維持にも関与していること、その破綻が自己免疫発症につながることを初めて明らかにできた。

問題点

<雑誌論文> 代表論文 5 編以内

1. Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. *J Immunol*. レフェリー有 196(7):3019-31.2016
2. Katakai T, Kondo N, Ueda Y, and Kinashi T, Autotaxin Produced by Stromal Cells Promotes LFA-1-Independent and Rho-Dependent Interstitial T Cell Motility. *J Immunol* レフェリー有 193:617-626, 2014
3. Katakai T, Habiro K, Kinashi T. Dendritic Cells Regulate High-Speed Interstitial T Cell Migration in the Lymph Node via LFA-1/ICAM-1. *J Immunol* レフェリー有 191(3):1188-99. 2013
4. Tomiyama T, Ueda Y, Katakai T, Kondo N, Okazaki K, Kinashi T. Antigen-specific suppression and immunological synapse formation by regulatory T cells require the mst1 kinase. *PLoS One*. レフェリー有 8(9):e73874, 2013.
5. Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T,

Ikehara S, Matsumoto M, Kinashi T, Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen-recognition in the thymus. *Nat. Commun.* レフェリー有 3:1098. 2012

<図書> 該当なし

<学会発表> 主要な発表 5 件以内

1. Kondo N, Ueda Y, Kinashi T, High-affinity LFA-1/ICAM-1 binding triggers the reorganization of vesicular transport regulators to facilitate the maturation of immunological synapse. (1P-0317) The 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan 2016. 11.30-12.2 Yokohama
2. Ueda Y, Kondo N, Kinashi T, Rap1-deficiency caused defective lymph node homing of lymphocytes and thymocyte-selection. (3-E-W31-11-O/P) The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. 2016. 12.5-7 Okinawa
3. Kinashi T. Roles of Rap1 signaling in immune synapse formation and self-tolerance. The 6th Xiamen Winter Symposium, Xiamen China 2015 Dec.5-7,
4. Kinashi T., Ueda Y., Kondo N., Visualization of thymocyte trafficking and selection processes: the importance of Rap1 signaling and integrins, International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities, Jan 26th–28th 2015、Kyoto.
5. Ueda Y., Kondo N., Kinashi T., Sema3E-Plexin signals regulate thymocyte migration by modulating Rap-1-dependent integrin activation, The 37th NAITO CONFERENCE ON Bioimaging-a paradigm shift for the life sciences (ポスター番号 PS[I]-39) July 15-18, 2014, Niseko, Hokkaido, Japan
6. Kinashi T., Kondo N., Single-Molecule Analysis of LFA-1/ICAM-1 Binding in Lymphocyte. Biophysical Society 58th Annual Meeting. the Moscone Center, San Francisco USA. 15th - 19th Feb, 2014.

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講座等名	内科学第三講座	事業推進	岡崎 和一
分担研究課題	IgG4 関連疾患・自己免疫性消化器疾患動物モデル開発と診断治療		
キーワード	IgG4 関連疾患、炎症性腸疾患、自己免疫性肝疾患、自己免疫性膵炎		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	18 名		
<p>研究組織(本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等)</p> <p>1. IgG4 関連疾患動物モデル開発と解析: 西尾彰功(准教授)、内田一茂(講師)、池浦司(講師)、安藤祐吾(講師)、富山 尚(助教), 大学院生: 池宗真奈美、柳川雅人、津久田 諭</p> <p>2. 自己免疫性消化器疾患動物モデル開発と解析: 福井寿朗(講師), 岡崎 敬(助教) 大学院生: 豊永貴彦、宮本早知、谷村雄志、諏訪兼彦、榊田昌隆、中丸光、坂尾将幸、武尾真宏、松井芙美、</p>			
<p>研究成果の概要(平成 24~28 年度の研究成果について)</p> <p>1. IgG4 関連疾患動物モデル開発と解析</p> <p>本研究ではわが国より発信された難治性疾患である IgG4 関連疾患の膵病変である自己免疫性膵炎の発症機序を明らかにすることを目的に、疾患関連抗原に特異的な自己免疫性膵炎モデルマウスや poly I:C 免疫膵炎モデルマウスを開発作成し、末梢血、膵・胆管・肝組織を用いて、免疫・分子生物学的解析を行った。更にステロイドや免疫抑制剤以外に膵炎発症時の小胞体ストレスとその軽減による膵炎治療効果について検討し、新規治療法の開発を行った。</p> <p>その結果、poly:IC を MRL マウスに投与して、TLR 3 を賦活して、膵炎、胆管炎、唾液腺炎などの発症を認め、自然免疫系の異常反応が自己免疫性膵炎発症に関わる可能性が示唆された。膵炎モデルマウスに elf-2α 脱リン酸化阻害薬投与により膵組織でのリン酸化 elf-2α 発現の増強と関連して膵炎の軽減が認められた。</p> <p>2. 自己免疫性消化器疾患動物モデル開発と解析</p> <p>本研究では大腸癌発生母地として問題となる潰瘍性大腸炎の動物モデルを用いて、発症機序を解析するとともに、新規治療法の開発を行うことを目的とした。ヒトの炎症性腸疾患発癌モデルと考えられる、大腸癌モデルマウスを作成し、我々の開発した消化管幹細胞マーカーであるリンカー部スレオニンリン酸化 Smad2, 3 蛋白 (pSmad2/3L-Thr) に対する抗体を用いて、腫瘍幹細胞としての可能性や発癌メカニズムについて解析した。更に実験的大腸炎モデルを用いて小胞体ストレスとその軽減による腸炎治療効果について検討し、新規治療法の開発を行った。</p> <p>その結果、大腸癌モデルマウスにおいては、非腫瘍部(炎症部)においては、pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞は組織幹細胞の存在部位に認められたが、腫瘍部では腫瘍の辺縁に散在性に認められ、数は増加していなかった。pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞の一部に BrdU の長期陽性細胞が認められ、組織幹細胞同様の slow-cycling な β カテニン陽性の腫瘍細胞であることが確認出</p>			

来た。潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいては小胞体ストレスシグナル伝達経路の下流分子 $\text{elf-2}\alpha$ の脱リン酸化阻害薬 (salubrinal) を腹腔内投与して腸炎の改善効果を認めた。

優れた成果があがった点

1. IgG4 関連疾患動物モデル開発と解析:

①自然免疫系の異常反応が自己免疫性膵炎発症に関わる可能性が示唆された点は病因解明における新規知見と考えられる。

②副作用の多いステロイドや免疫抑制剤以外での治療標的の可能性が示唆された。

2. 自己免疫性消化器疾患動物モデル開発と解析

①大腸癌モデルマウスにおける pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞の腫瘍幹細胞のマーカーになる可能性を示唆した事。

②副作用の多いステロイドや免疫抑制剤以外での治療標的の可能性が示唆された。

問題点

1. IgG4 の病因や病態における意義の解明は IgG4 サブクラスのないマウスでは難しく、免疫学的なヒューマナイズドマウスなどの開発がのぞまれる。

2. 長期慢性腸炎マウスモデルの開発を追加して、治療効果について更に検討する必要がある。

<雑誌論文> 代表論文 5 編以内

1. Okazaki T, Nishio A, Takeo M, Sakaguchi Y, Fukui T, Uchida K, Okazaki K. Inhibition of the Dephosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 α Ameliorates Murine Experimental Colitis. Digestion. レフェリー有 2014;90(3):167-178
2. Suzuki R, Fukui T, Kishimoto M, Miyamoto S, Takahashi Y, Takeo M, Mitsuyama T, Sakaguchi Y, Uchida K, Nishio A, Okazaki K. Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. J Crohns Colitis. レフェリー有 2015;9:565-74
3. Fukuhara T, Tomiyama T, Yasuda K, Ueda Y, Ozaki Y, Son Y, Nomura S, Uchida K, Okazaki K, Kinashi T. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. レフェリー有 Biochem Biophys Res Commun. 2015;463(4):968-74.
4. Toyonaga T, Nakase H, Ueno S, Matsuura M, Yoshino T, Honzawa Y, Itou A, Namba K, Minami N, Yamada S, Koshikawa Y, Uede T, Chiba T, Okazaki K. Osteopontin Deficiency Accelerates Spontaneous Colitis in Mice with Disrupted Gut Microbiota and Macrophage Phagocytic Activity. PLoS One. レフェリー有 2015 Aug 14;10(8):e0135552. doi: 10.1371/journal.pone.0135552.

5. Arai Y, Yamashita K, Kuriyama K, Shiokawa M, Kodama Y, Sakurai T, Mizugishi K, Uchida K, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Kudo M, Okazaki K, Strober W, Chiba T, Watanabe T. Plasmacytoid Dendritic Cell Activation and IFN- α Production Are Prominent Features of Murine Autoimmune Pancreatitis and Human IgG4-Related Autoimmune Pancreatitis. J Immunol. レフェリー有 2015;195(7):3033-44
6. Sakao M, Sakaguchi Y, Suzuki R, Takahashi Y, Kishimoto M, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Matsuzaki K, Okazaki K. Smad2/3 Linker Phosphorylation Is a Possible Marker of Pancreatic Stem/Progenitor Cells in the Regenerative Phase of Acute Pancreatitis. Pancreas. レフェリー有 2017;46:605-613.

<図書>

Kazuichi Okazaki・Springer・IgG4-related disease・2017・128 頁

<学会発表> 主要な発表 5 件以内

1. Toshiro Fukui, Ryo Suzuki, Masanobu Kishimoto, Yu Takahashi, Sachi Miyamoto, Kazushige Uchida, Akiyoshi Nishio, Kazuichi Okazaki Carcinogenic and stem cell-like phenotypes of Smad2/3 linker phosphorylation in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer. APDW (Asian Pacific Digestive Week) 2015 Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan. 2015. 12
2. K Uchida, Y Fukui, T Mitsuyama, H Miyoshi, T Ikeura, M Shimatani, T Fukui, M Matsushita, M Takaoka, A Nishio, K Okazaki. The Pathophysiological Role of Toll-like Receptor Signaling in Type 1 Autoimmune Pancreatitis. Asian Pasific Digestive Week 2015. 12
3. The Role of Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 1 Autoimmune Pancreatitis. K Uchida, Y Fukui, M Yanagawa, T Mitsuyama, K Sumimoto, T Ikeura, Y Sakaguchi, M Shimatani, T Fukui, M Matsushita, M Takaoka, A Nishio, S Sato, AH Kwon, K Okazaki. 45th Anniversary Meeting of American Pancreatic Association and Japan Pancreatic Society. 2014.11
4. 福井寿朗 岸本真房 高橋悠 鈴木亮 宮本早知 谷村雄志 松本泰司 中島淳 坂尾将幸 内田一茂 西尾彰功 岡崎和一 腸炎関連大腸癌モデルマウスにおける Smad2/3 蛋白リンカー一部リン酸化の発癌との関連性についての検討 第 7 回日本炎症性腸疾患学会 2016/7/8-9 (国立京都国際会館)

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	微生物学講座	事業推進	藤澤順一
分担研究課題	HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた ATL 治療法の開発		
キーワード	HTLV-1、ATL、ヒト化マウス、Tax、ワクチン		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	9 名		
<p>研究組織(本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等)</p> <p>藤澤順一(教授):研究の統括 竹之内徳博(准教授):統計解析 田中正和(助教):抗 Tax ワクチンの解析 上野孝治(助教):ウイルス遺伝子の機能解析 Ancy Joseph(特別研究員):ウイルス遺伝子の <i>in vivo</i> 機能解析 姚 錦春(大学院生):宿主遺伝子の発現解析 任 翊華(大学院生):ウイルス遺伝子の発現制御 荀 潤澤(特別研究員・転出):ウイルス遺伝子発現の解析 手塚健太(大学院生・卒業/転出):抗 HTLV-1 宿主免疫の解析</p>			
<p>研究成果の概要(平成 24~28 年度の研究成果について)</p> <p>本邦には 100 万人以上のヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染者が存在し、約 5% の生涯発症率で平均余命 1 年以内の悪性の白血病、成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症するが、ATL に対する治療法は未だに確立されていない。発症予防法や治療法の開発には感染モデル動物が必須であることから、我々はこれまでに、重度免疫不全マウス (NOG あるいは NSG; NOD-SCID/IL-2 receptor γ chain knock-out) 骨髄内への臍帯血由来 CD133 陽性ヒト造血幹細胞の移植により、ヒトの造血系を持つヒト化マウスを作製し、これに HTLV-1 を感染させることで、感染 T 細胞の腫瘍性増殖、ATL に特徴的な花弁様分様核を有するリンパ球の出現等、ATL 様の病態を再現することに成功した。同感染マウスモデルにおいては、HTLV-1 感染にตอบสนองした種々のサイトカイン産生、抗 HTLV-1 IgG 抗体、および抗 HTLV-1 Tax 細胞障害性 T 細胞 (CTL) の発現も確認され、これまで発表されているヒト化マウスの系では不十分とされていたヒト宿主免疫の再構築が達成された。</p> <p>3) HTLV-1 感染マウスに対する AZT および IFN-α 投与の有効性を検討したところ、併用群においてはほぼ完全に感染細胞の増殖が抑制され、AZT/IFN 併用療法の有効性が確認された。</p> <p>4) HTLV-1 の発がん蛋白 Tax の発現抑制作用が培養細胞レベルで示されている HSP90 阻害剤ゲルダナマイシンの低毒性誘導体 17-DMAG の個体レベルでの効果を検討したところ、感染細胞の増加が顕著に抑制され、さら</p>			

に感染マウスの期間生存率も上昇した。

- 5) Tax 蛋白全長(353aa)にわたる 12 種類の 40 アミノ酸長のロングペプチド混合物をアジュバントとともにヒト化マウス皮下あるいは鼻腔にワクチン投与後 HTLV-1 を感染したところ、感染細胞の増殖遅延と感染マウスの生存率上昇が観察された。
- 6) HTLV-1 感染細胞のヒト化マウスへの経口投与により、低レベルでの HTLV-1 感染が長期に維持される HTLV-1 感染無症候キャリアモデルが確立された。

優れた成果があがった点

CD133 陽性ヒト造血幹細胞を NOG マウスの骨髄内に直接移植することで、高い移植効率の達成と、これまで不十分とされていたヒト宿主免疫の再構築に成功した。これらの改良点が奏功し、ATL 様の病態を再現するマウスモデルの構築に世界で初めて成功した。同マウスモデルを用いて、複数の候補薬剤の投与実験において個体レベルでの抗 HTLV-1 活性が実証されたことから、今後、さらなる化合物の同定と、作用機序解明への応用が期待される。さらに、Tax ペプチドワクチンの皮下および鼻腔投与において、感染予防/感染細胞増殖抑制効果が確認されたことから、同マウスモデルを用いた、抗 HTLV-1 ワクチンの開発にむけた研究が可能となった。

問題点

Tax ペプチドワクチンの効果を用いるアジュバントにより大きく影響されることを観察しており、ワクチンの開発にはアジュバントの検討が必須となる。

また、HTLV-1 感染者の大部分は無症候キャリアとなることから、ATL 治療法の開発に加えて無症候キャリアからの発症予防法開発が重要な課題である。HTLV-1 感染細胞のヒト化マウスへの経口投与により、HTLV-1 感染無症候キャリアモデルの作出に成功したが、採取できる血液量に限度があるため、現行の定量的 PCR 法では低レベルでの感染を長期的・定量的に追跡することが困難である。今後、デジタル PCR や次世代シーケンサーを用いた高感度の感染定量法の開発が必要である。

疾患モデル動物センターに係る業績<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Kenta Tezuka, Runze Xun, Mami Tei, Takaharu Ueno, Masakazu Tanaka, Norihiro Takenouchi and Jun-ichi Fujisawa: An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity. Blood [レフェリー有], 123, 346-355, 2014
2. E.Ikebe, A Kawaguchi, K. Tezuka, S.Taguchi, S. Hirose, T. Matsumoto, T. Mitsui, K. Senba, A. Nishizono, M.Hori, H.Hasegawa, Y. Yamada, T. Ueno, Y. Tanaka, H. Sawa, W. Hall, Y. Minami, K-T. Jeang, M. Ogata, K. Morishita, H. Hasegawa, J. Fujisawa and H. Iha: Oral administration of an HSP90 inhibitor, 17-DMAG, intervenes tumor-cell in filtrationin to multiple organs and improves survival period for ATL model mice. Blood Cancer Journal [レフェリー有], 3, e132(ページなし), 2013
3. Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Jun-ichi Fujisawa Carrier model of HTLV-1 infection in humanized NOG mice. Retrovirology [レフェリー無] 11(Suppl1), P43, 2014
4. Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Hidekatu Iha, Jun-ichi Fujisawa Inhibition of ATL development in humanized mouse model by AZT/INF treatment. Retrovirology [レフェリー無], 11(Suppl1), P43, 2014
5. Jun-ichi Fujisawa, Sung-il Lee, Jinchun Yao, Yihua Ren, Masakazu Tanaka. Tax peptide vaccine suppressed the leukemia in humanized mouse. Retrovirology [レフェリー無], 12(Suppl1), O43, 2015

<図書> 該当なし

<学会発表> 主要な発表 5 件以内

1. 藤澤順一
ATL-like phenotype in HTLV-1 infected humanized mouse model
25th International Conference on Antiviral Research, 札幌、2012.4.17.
2. 手塚健太、上野孝治、鄭真美、荀潤澤、田中正和、竹之内徳博、藤澤順一
IBMI-ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染マウスモデル
第 1 回 ATL シンポジウム、東京、2012.8.25.
3. Kenta Tezuka, Mami Tei, Takaharu Ueno, Runze Xun, Hidekatu Iha, Jun-ichi Fujisawa:
Inhibition of ATL development in humanized mouse model by AZT/INF treatment.
16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, Montreal, Canada. 2013.6.27.
4. Jun-ichi Fujisawa, Sung-il Lee, Jinchun Yao, Yihua Ren, Masakazu Tanaka:
Tax peptide vaccine suppressed the leukemia in humanized mouse. 17th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, Trois Ilets, Martinique 2015.6.21
5. Ancy Joseph, Takaharu Ueno, Yihua Ren, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Masakazu Tanaka, Jun-ichi Fujisawa: Both HBZ Protein and mRNA are Required for Leukemic Growth of HTLV-1-infected T-cells in Humanized Mouse Model. 18th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, Tokyo, 2017.3.10

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講座等名	衛生学講座	事業推進	藺田 精昭
分担研究課題	組織幹細胞の特性解明と難病治療への応用		
キーワード	造血幹細胞、間葉系幹細胞、臍帯血、CD34、SRC、再生医療		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			8名
研究組織(本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等)			
<p>藺田精昭(教授):研究計画全般の企画、実験指導、及び統括 佐々木豊(准教授、平成28年7月退職)、藤岡龍哉(准教授):実験計画立案・指導・実施の支援 松岡由和(助教)、中塚隆介(助教):実験計画の立案、指導、及び実施 高橋雅也(大学院修了)、角出啓輔(大学院修了、特別研究員)、河村 孟(大学院、4年生) :実験の実施</p>			
研究成果の概要(平成24~28年度の研究成果について)			
(目的)			
<p>本課題研究では、ヒト臍帯血由来未分化造血幹細胞(HSC)の超高度純化と単一細胞レベルでの解析を目指して研究を推進した。並行して、HSC支持能(ニッチ機能)を持つヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)を樹立して、そのHSC支持機構の解明を目指した。</p>			
(研究成果)			
<p>1)ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSCs の陽性分子マーカーである CD133 の同定(Leukemia, 2014) ヒト臍帯血由来 18Lin⁻CD34⁻細胞を用いて、この分画に発現している HSC 特異的な分子、接着や遊走に関わる分子を網羅的に FACS 解析し、CD133 抗原を同定した。興味あることに、SRC 活性は CD34⁺CD133⁺分画のみに認められたことから、CD133 抗原はヒト臍帯血由来 CD34⁺HSCs の共通の陽性分子マーカーであることが初めて明らかにされた。限界希釈法(LDA)で測定した CD34⁺CD133⁺SRCs の頻度は、各々、1/99、1/142 であった。</p>			
<p>2)ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSCs の陽性分子マーカーである GPI-80 の同定(Blood, 2016) 1)と同様にして、ヒト臍帯血由来 CD34⁺SRCs の高度濃縮マーカーとして glycosylphosphatidylinositol- anchored protein (GPI-80)を同定した(特願2014-090292)。GPI-80 は、従来好中球の遊走マーカーとして報告されていた分子である。LDA で測定した CD34⁺GPI-80⁺SRCs の頻度は、各々、1/21、1/35、1/28、1/874 であった。このことから、GPI-80 は、CD34⁺SRC の高度濃縮に極めて有用であることが示された。</p>			
<p>3)2つの陽性分子マーカーを用いる超高度純化法の開発(第58回米国血液学</p>			

会発表、投稿中)

前述した陽性/濃縮分子マーカーである CD133 と GPI-80 に対する抗体を同時に用いることにより、ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSCs を超高度に純化する方法を開発した。LDA で測定した CD34⁺CD133⁺GPI-80⁺HSCs の頻度は、各々、1/5、1/8 と世界最高レベルであった。その結果、これらの細胞を用いる単一細胞レベルでの解析が可能となった。単一細胞のメチルセルロース法によるコロニー形成能より、CD34⁺HSC が高い megakaryocyte/erythrocyte 分化能を有することが明らかになった。また、NSG マウスを用いる単一細胞の移植実験により、CD34⁺HSCs が高い増殖能、T 細胞系を含む全血球系統への分化能、さらに自己複製能を持つことが明瞭に示された。興味あることに、単一細胞レベルの遺伝子発現解析により、CD34⁺HSC が CD34⁺HSC とは異なるユニークな遺伝子発現パターンを示すことが初めて明らかにされた。このことから、CD34⁺HSC の自己複製や増殖・分化、epigenetic 制御機構は、CD34⁺HSC とは異なることが示唆された。一連の研究により、ヒト HSC の階層制上で頂点にある CD34⁺HSC の新たな分化経路が明らかにされた。

4)ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSC 支持能(ニッチ機能)を持つヒト骨髄 CD45⁻細胞由来間葉系幹細胞(MSCs)の樹立(Stem Cells, 2015)

ヒト骨髄細胞由来 Lin⁻CD45⁻細胞より、抗 CD271 及び抗 SSEA-4 抗体を用いることにより、間葉系幹細胞(MSCs)を予期的に分離することにも成功した。中でも、CD271⁺SSEA-4⁺細胞に由来する MSCs(DP MSCs)(特願 2013-170480)が、高い CD34⁺SRC 支持能(ニッチ機能)を持つことを明らかにした(第 52 回米国血液学会発表)。この DP MSC を用いて、*in vitro* 及び *in vivo* で CD34⁺SRC (HSC)とニッチにおける HSC/MSC の相互作用の解明を行ない、ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSC と DP MSC の接着の重要性を明らかにした。

5)ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSC の分化指向性に関する研究(Blood Cancer J, 2015)

我々は、骨髄内移植 (IBMI) 法を開発することにより、ヒト臍帯血由来 CD34⁺SRC の確実な同定に世界で初めて成功した(Blood, 2003)。マウス HSC の最近の研究により、未分化な HSC は myeloid-biased の分化指向性を持つことが報告されている。しかしながら、ヒト HSC に関しては詳細な研究はなされていなかった。我々は、ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSC について、IBMI 法を用いてその分化指向性について検討し、CD34⁺HSC が myeloid-biased HSC であり、CD34⁺HSC が lymphoid-biased HSC であることを明らかにした(第 12 回幹細胞シンポジウム発表)。

6)ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSCs における MPL 発現の機能的意義(Cell Transplant, in press)

マウス HSC においては、THPO/MPL シグナルがニッチにおける未分化 HSC の維持に重要との報告がある。しかしながら、ヒト HSC における THPO/MPL シグナルの機能的意義は明らかにされていなかった。我々は、ヒト臍帯血由来の HSCs を CD34 と MPL の発現により、CD34⁺MPL⁺HSC の 4 分画に亜分画し、その長期ヒト造血再構築能について NOG マウスを用いて検討した。その結果、1) CD34⁺MPL⁺SRC がヒト造血を一次マウスで 6 か月間維持する short-term HSC であること、2)CD34⁺MPL⁺SRC は、ヒト造血を二次マウスまで 1 年間維持する intermediate-term HSC であること、3)CD34⁺MPL⁺SRCs はヒト造血を三次マウス

スまで1年間以上維持する long-term HSCであることを初めて明らかにした。以上より、THPO/MPL シグナルのヒト造血における機能はマウスと異なる可能性が示唆された。

7)異なる二系統の重症免疫不全マウスのヒト HSC 支持機構の違い(第 16 回日本再生医療学会発表)

ヒト HSC 活性は、重症免疫不全マウス(NOG, NSG マウス等)を用いる SRC として測定されている。以前、SRC 活性を測定する際に、NOG マウスに比べて NSG マウスの方が測定感度が高いと報告されていたが、その機序は不明であった。我々は、3)で述べた超高度純化法で分取した CD34⁺CD133⁺GPI-80⁺HSCs を用いて、200 個/マウス、5~10 個/マウスでの移植実験を行った。その結果、移植する HSC 数が 5~10 個と少ない場合には、NSG マウスでの生着率が NOG マウスに比べて有意に高いことを明らかにした。これまでの解析により、重症免疫不全マウスにおけるヒト HSC の生着にはマウスの自然免疫系が関与する可能性を示した(投稿準備中)。

優れた成果があがった点

ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSCs の陽性/濃縮分子マーカーとして、CD133 と GPI-80(特願 2014-090292)の同定に成功したことは特筆される。その結果、単一細胞レベルでの移植実験や遺伝子解析が可能となり、近い将来にヒト CD34⁺HSCs の自己複製、維持、増殖分化機構が解明される可能性がある。

また、CD34⁺HSC を効率的に支持するヒト骨髄由来 DP MSC を樹立(特願 2013-170480)したことは、ニッチにおける HSC 支持機構の解明に極めて重要と考えられる。

問題点

ヒト臍帯血由来 CD34⁺HSCs を単一細胞レベルで解析することを可能したが、未だにそれらの自己複製因子の同定には成功していない。また、樹立した DP MSC は、*in vitro* 共培養系で高い CD34 SRC 支持能を示し、この HSC 支持機能の発現には HSC と DP MSC の接着が重要であることは明らかにしているが、その分子機序の解明が残されている。

<雑誌論文> 代表論文 5 編以内

1. Matsuoka Y, Takahashi M, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sonoda Y, CD34 Antigen and the MPL Receptor Expression Defines A Novel Class Of Human Cord Blood-Derived Primitive Hematopoietic. Stem Cells. *Cell Transplantation*, レフェリー有 in press.
2. Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sonoda Y: GPI-80 Expression Highly Purifies Human Cord Blood-derived Primitive CD34-negative Hematopoietic Stem Cells. *Blood* レフェリー有 128(18):2258-2260,2016.
3. Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, Kawamura H, Takahashi M, Fujioka T, Uemura Y, Asano H, Sasaki Y, Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Hino M, Sonoda Y: Prospectively Isolated Human Bone Marrow Cell-derived MSCs Support Primitive Human CD34-negative Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells* レフェリー有 33:1554-1565, 2015.
4. Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y: Human Cord Blood-derived CD34-negative Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are Myeloid-biased Long-term Repopulating HSCs. *Blood Cance J* , レフェリー有 5:e290;doi:10.1038/bcj. 2015.
5. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, Sasaki Y, Matsui K, Asano H, Kaneko K, Sonoda Y: CD133 is a Positive Marker for a Distinct Class of Primitive Human Cord Blood-derived CD34-negative Hematopoietic Stem Cells. *Leukemia* レフェリー有 28:1308-1315, 2014.

<図書> 主要な図書 5 冊以内

1. 藪田精昭:造血幹細胞研究の変遷と展望—ヒト造血幹細胞の純化と階層制の解明—、白血病学(上)—最新の基礎・臨床研究—、日本臨床社、東京、pp7-14, 2016.
2. 藪田精昭:ヒト造血幹細胞の特性。造血器腫瘍アトラス改訂第 5 版、日本医事新報社、東京、pp18-31,2016.
3. Sonoda Y: Human CD34-negative hematopoietic stem cells. Book chapter in Ratajczak M, ed. “Adult Stem Cell Therapies : Alternatives to Plasticity”. Humana Press, Springer, Berlin, pp.53-77, 2014.
4. 藪田精昭: 骨髓内移植法。臍帯血移植の基礎と臨床、医学書院、東京、pp.220-226, 2014.

<学会発表> 主要な発表 5 件以内

1. Sumide K, Matsuoka Y, Nakatsuka R, Kawamura H, Fujioka T, Asano H, Sonoda Y, Isolation of single human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells (HSCs) residing at the apex of the human HSC hierarchy. The 58th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA, December 4,2016.
2. Matsuoka Y, Sumide K, Kawamura H, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y, GPI-80 defines primitive human cord blood-derived CD34-positive and negative hematopoietic stem cells. The 57th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orland, USA, December 6,2015.
3. Sonoda Y, CD34-negative hematopoietic stem cells as a new entity and source of cell

therapy. The 6th Meeting of Asian Cellular Therapy Organization, Gwang-ju, Korea, August 20, 2015. (Keynote Lecture)

4. Matsuoka Y, Sumide K, Takahashi M, Nakatsuka R, Fujioka T, Sasaki Y, Sonoda Y, Cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells (HSCs) are myeloid-biased HSCs residing at the apex of the human HSC hierarchy. The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka, May 30, 2014.
5. Takahashi M, Matsuoka Y, Sumide K, Nakatsuka R, Fujioka T, Kohno H, Sasaki Y, Matsui K, Asano H, Kaneko K, Sonoda Y, CD133 is a positive marker of human cord blood-derived CD34-negative hematopoietic stem cells. The 55th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, USA, December 7, 2013.

<特許申請・取得状況>

特許申請

発明の名称: 間葉系幹細胞の分離方法

出願日: 平成 25 年 8 月 20 日

出願番号: 特願 2013-170480

発明者: 藺田精昭、松岡由和、中塚隆介、飯田寛和

出願人: 学校法人 関西医科大学

特許申請

発明の名称: ヒト造血幹細胞濃縮画分の製造方法

出願日: 平成 26 年 4 月 24 日

出願番号: 特願 2014-090292

発明者: 藺田精昭、松岡由和、角出啓輔

出願人: 学校法人 関西医科大学

研究成果報告書の概要

講座等名	生体情報部門	事業推進者	松田 達志
分担研究課題	代謝シグナル破綻によるモデル疾患動物の開発と解析		
キーワード	mTORC1、Raptor、Tsc1、細胞増殖、細胞分化		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			1名
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）			
松田 達志：研究の総括			
研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）			
<p>免疫担当細胞の生存・分化・増殖過程においてエネルギー代謝レベルは厳密に制御されている。本研究では、代謝シグナル制御に関わる PI3K-mTORC1 シグナル伝達経路の各種遺伝子改変マウスを作製することで、代謝シグナルの破綻がもたらす免疫病態の解明を目指している。</p> <p>具体的には、mTOR 経路の中でも、特に細胞増殖と密接に関わる mTORC1 経路に着目し、mTORC1 シグナルに必須のアダプター分子である Raptor 分子の細胞系譜特異的欠損マウスの樹立に取り組んだ。Raptor 分子を T 細胞系列特異的に欠失させたところ、末梢のヘルパー T 細胞の機能分化が部分的に阻害されることが分かった。また、活性化に伴う T 細胞の生存率が mTORC1 シグナルの無い状態では著しく低下する可能性も示唆された。また、樹状細胞系譜特異的に Raptor 分子を欠損させると、腸管における従来型樹状細胞の IL-10 産生能の低下と、それに伴う腸管免疫応答の異常亢進が観察された。すなわち、mTORC1 シグナルが、従来型樹状細胞において抑制性サイトカイン IL-10 の産生を介したホメオスタシス調節に関与することが明らかとなった。さらに B 細胞系譜特異的 Raptor 欠損マウスを樹立したところ、骨髄において B 細胞分化の停止が認められる一方、腸管においてのみ IgA 陽性の細胞が機能していることが明らかになった。</p> <p>一方、mTORC1 シグナルを負に制御する Tsc1B 細胞系譜特異的に欠失させるために mb1-Cre x Tsc1-flox マウスを樹立したところ、予想に反して B 細胞分化に大きな異常は認められなかったものの、100%の頻度で腎嚢胞を発症することが分かった。詳細な解析の結果、B 細胞を欠損させた場合でも腎嚢胞が発症すること、これまで B 細胞系譜特異的に Cre を発現すると考えられてきた mb1-Cre マウスが腎臓の発生初期に一過的に Cre を発現していることなどが明らかとなった。現在、mb1-Cre x Tsc1-flox マウスを利用して、腎嚢胞の発症のメカニズム解明に取り組んでいる。</p>			
優れた成果があがった点			
<p>Raptor コンディショナルノックアウトマウスを用いることで、従来は薬剤を用いて解析されてきた mTORC1 シグナルの免疫系における重要性を、個体レベルで検証することに成功した。また、mb1-Cre x Tsc1-flox マウスという、全く新しい腎嚢胞の病態モデルを見出した。</p>			

問題点
特になし

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Hoshii, T., Kasada, A., Hatakeyama, T., Ohtani, M., Tadokoro, Y., Naka, K., Ikenoue, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Fehling, H.J., Araki, K., Yamamura, K., Matsuda, S., and Hirao, A. Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* レフェリー有 **111**: 3805-3810.2014
2. Hirata, Y., Sugie, A., Matsuda, A., Matsuda, S., and Koyasu, S. TAK1-JNK axis mediates survival signal through Mcl1 stabilization in activated T cells. *J. Immunol.* レフェリー有 **190**: 4621-4626. 2013
3. Takayama, G., Ohtani, M., Minowa, A., Matsuda, S., and Koyasu, S. Class I PI3K-mediated Akt and ERK signals play a critical role in FcεRI-induced degranulation in mast cells. *Int. Immunol.* レフェリー有 **25**: 215-220. 2013
4. Ohtani, M., Hoshii, T., Fujii, H., Koyasu, S., Hirao, A. and Matsuda, S. mTORC1 in intestinal CD11c⁺CD11b⁺ dendritic cells regulates intestinal homeostasis by promoting IL-10 production. *J. Immunol.* レフェリー有 **188**: 4736-4740. 2012
5. Kurebayashi, Y., Nagai, S., Ikejiri, A., Ohtani, M., Ichiyama, K., Baba, Y., Yamada, T., Egami, S., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., and Koyasu, S. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of RORγ. *Cell Reports* レフェリー有 **1**: 360-373. 2012

<図書>主要な図書 5 冊以内

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. 逆井智貴、田中順子、松田達志、水野聖哉、濱田理人、高橋智、三輪佳宏 近赤外イメージングマウスを用いたリンパ球集積から見る炎症反応の可視化 第39回日本分子生物学会年会 横浜 2016.11.
2. Ohtani, M., Fujii, H., Ohara, O., Koyasu, S., Kubo, M., Matsuda, S. B-lineage specific loss of mTORC1 signal causes selective production of IgA against commensal bacteria. The 43th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kyoto. 2014. 12.
3. Matsuda, S., and Ohtani, M. Role of the mTORC1 signaling pathway in thymocyte development. The 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Makuhari. 2013. 12.
4. Nagai, S., Kurebayashi, Y., Ikejiri, A., Ohtani, M., Baba, Y., Hoshii, T., Hirao, A., Matsuda, S., Koyasu, S. PI3K-Akt-mTORC1-S6K axis controls Th17 differentiation. 第35回日本分子生物学会年会 福岡 2012.12.
5. Matsuda, S., and Ohtani, M. Role of the mTORC1 signaling pathway in T cell function. The 41th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kobe. 2012. 12.

<特許申請・取得状況>

研究成果報告書の概要

講座等名	医化学講座	事業推進者	伊藤誠二
分担研究課題	慢性疼痛モデルによる神経可塑性		
キーワード	末梢神経再生モデル動物、慢性疼痛モデル動物、コンディショナル遺伝子改変マウス		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	10名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>教授・伊藤誠二 …研究の計画立案と総括</p> <p>講師・松村伸治 …慢性疼痛モデル動物の機能解析</p> <p>講師・片野泰代 …神経障害性疼痛モデル、末梢神経再生動物モデルに関する実験</p> <p>助教・西田和彦 …慢性疼痛モデル動物への遺伝子導入と作製</p> <p>助教・井上明俊 …搔痒モデルの作用機構</p> <p>助教・舩津宣雄 …<i>ovol2</i> 遺伝子欠損マウスの解析</p> <p>非常勤講師・矢尾育子 …高次脳機能に関する遺伝子の同定とノックアウトマウスの機能解析</p> <p>大学院生・谷口久哲 …<i>ovol2</i> 遺伝子の精子形成における役割の解明</p> <p>大学院生・Nguyen Huu Tu …末梢神経再生動物モデルの作製と解析</p> <p>大学院生・Pham Minh Vuong …糖尿病モデルマウスにおける神経再生</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>1. 末梢神経再生動物モデル</p> <p>脊髄や脳は分解物の除去ができないことや阻害因子等のため神経再生・神経回路の再構築は容易でないが、末梢神経では秩序だった神経再生・機能回復がみられる。神経再生には、細胞、場、増殖因子の 3 要素が必要である。我々は、末梢神経の再生機構を明らかにするために、坐骨神経（細胞）を切断し、切断端をシリコンチューブ（場）で接続し、増殖因子をはじめとして様々な物質を 4 週間持続的に注入できる末梢神経再生モデルを確立した。このモデルを Na チャネルの 1 つ Na_x のノックアウトマウスに適用して、神経細胞と支持細胞である Schwann 細胞の間で乳酸のエネルギーカップリングが、末梢神経再生に重要な役割をはたしていることを明らかにした。</p> <p>2. 神経障害性疼痛動物モデル</p> <p>NIPSNAP1、SCRAPPER、BEGAIN をはじめ、神経障害性疼痛や高次脳機能に関連する遺伝子を同定、それらの改変マウスを作製し、その機能解析・行動解析を行った。また、帯状疱疹後神経痛モデル、術後痛モデル、糖尿病モデルを作製し、その発生維持機構の解明、治療法の開発を行った。</p> <p>3. <i>Ovol</i> 遺伝子欠損マウス</p> <p><i>Ovol</i> はショウジョウバエの卵形成に関与する転写因子 <i>ovo</i> のマウスホモログで <i>ovoll</i> と <i>ovol2</i> が存在する。我々がクローニングした <i>ovol2</i> は ES 細胞に発現し、そのノックアウトマウスは胎生致死である。<i>Ovol2</i> は生殖原基や精巣に強く発現し、生殖細胞の形成に関与することを明らかにした。一方、<i>ovoll</i> ノックアウトマウスは出生し、皮膚で表現型を示す。<i>ovol2</i> と <i>ovoll</i> の関係を <i>ovol2</i> の皮膚でのコンディショナルノックアウトマウス、過剰発現マウスで検討した結果、<i>Ovol2</i> は皮膚の幹細胞にも発現しており、<i>ovoll</i> の遺伝子発現調節を行い、皮膚の表皮形成、皮膚のバリア機能形成に重要な役割をしていることを明らかにした。</p>			

優れた成果があがった点

- ◎ 末梢神経再生の動物モデルを確立し、再生部位で神経細胞と支持細胞間のエネルギーカップリングを明らかにして場の重要性を示したこと。
- ◎ 病態モデル、*in silico*、プロテオミクス等で我々が同定した 6 つの遺伝子の改変マウスを作製して、その機能解析、行動解析を行った、もしくは現在行っていること。

問題点

- ◎ *ovol2* の皮膚と異なる組織を文献で報告されている Cre マウスと交配してコンディショナルノックアウトマウスあるいはエレクトロポレーションで遺伝子導入して作製しようと試みたが、うまくいかなかったこと。Ovol2 の発現は我々が現在標的とする組織では幹細胞のある特定の時期にのみしか発現しないことが組織特異的ノックアウトマウスの作製を難しくしている。

<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年)
代表論文 5 編以内

1. Okuda-Ashitaka, E., Minami, T., Tsubouchi, S., Kiyonari, H., Iwamatsu, A., Noda, T., Handa, H. and Ito, S. Identification of NIPSNAP1 as a nocistatin-interacting protein involving pain transmission. *J. Biol. Chem.* **287**, 10403-10413, 2012. (レフェリー有)
2. Lee, B., Villarreal-Ponce, A., Fallahi, M., Ovadia, J., Sun, P., Yu, Q.C., Ito, S., Sinha, S., Nie, Q. and Dai, X. Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev. Cell* **29**, 47-58, 2014. (レフェリー有)
3. Katano, T., Fukuda, M., Furue, H., Yamazaki, M., Abe, M., Watanabe, M., Nishida, K., Yao, I., Hata, Y., Okumura, N., Nakazawa, T., Yamamoto, T., Sakimura, K., Takao, Y., Ito, S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. *eNeuro*, **3**, e0110-16(1-18), 2016. (レフェリー有)
4. Hayashi, M., Shinozuka, Y., Shigenobu, S., Sato, M., Sugimoto, M., Ito, S., Abe, K. and Kobayashi, S. Conserved role of Ovo in germline development in mouse and Drosophila. *Sci. Rep.* **7**, 40056, 2017. (レフェリー有)
5. Uchida, H., Matsumura, S., Okada, S., Suzuki, T., Minami, T. and Ito, S. RNA editing enzyme ADAR2 is a mediator of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *FASEB J.* in press, 2017. (レフェリー有)

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 主要な図書 5 冊以内

1. Katano T. and Ito, S. Chapter 5: Multifunctional roles of nitric oxide (NO) in neurons studies on pediatric disorders. *Oxidative stress in applied basic research and clinical practice.* (Human Press, Springer) 494 頁, 2014.
2. 西田和彦, 伊藤誠二. 8 章: 体性感覚の受容と伝達の分子機構. 「分子脳科学」DOJIN BIOSCIENCE SERIES 三品昌美編, (化学同人) 89-98 頁 (全 312 頁), 2014.
3. Okuda-Ashitaka, E., Ito, S. Nocistatin: milestone of one decade of research. *Cur. Pharm. Des.* **21**, 868-884, 2015.
4. 伊藤誠二. PACAP と神経障害性痛. 「痛みの Science & Practice 第 8 巻 臨床に役立つ神経障害性痛の理解」, (文光堂) 29-30 頁 (全 285 頁), 2015.
5. 伊藤誠二. 「痛覚のふしぎ 脳で感知する痛みのメカニズム」(講談社) 全 224 頁, 2017.

<学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は匡名と都市名)・発表年月)

主要な発表 5 件以内

1. Ito, S., Sasaki, A., Unezaki, S., Andoh, T., Matsumura, S., Katano, T., Nishio, N., Nakatsuka, T., Kuraishi, Y. and Minami, T. Characterization of postherpetic neuralgia in mice with

knock-in mutation of NMDA receptor. 14th World Congress on Pain, Milano, Italy, August 27-31, 2012.

2. Ito, S., Lu, J., Shimojo, M., Katano, T., Uchida, H. and Yao, I. Proteomic approach of nitrated tyrosine residues of protein kinase G-1 α . The 43rd annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, U.S.A. November 9-13, 2013.
3. Ito, S. Bifurcate roles of nitric oxide (NO) in neuropathic pain . The 44th NIPS International Symposium and The 5th Asian Pain Symposium, Okazaki, December 18-20, 2013.
4. Ito, S., Nguyen, H. T., Matsumura, S. and Katano, T. Involvement of endothelin in peripheral nerve regeneration. The 44th annual meeting of the Society for Neuroscience, Washington D.C., November 15-19, 2014.
5. 伊藤誠二, 片野泰代, 松村伸治, 西田和彦, 成熟した疼痛研究の新しい展開 New departure of mature pain research. 日本ペインクリニック学会第48回大会, 教育講演, 新宿, 2014年7月25日

<特許申請・取得状況>

1. 山下恵子, 黒崎靖夫, 春本誠, 島村京子, 海堀昌樹, 荒木吉朗, 権雅憲, 伊藤誠二
「局所麻酔薬持続徐放性リポソーム製剤」特願 2012-208890 出願日: 2012/9/21
PCT 出願番号: PCT/JP2013/075323 出願日: 2013/9/19 PCT の移行国: みなし全指定
出願中。国際公開済(公開番号 WO2014/046191)

研究成果報告書の概要

講座等名	神経機能	事業推進者	小早川 令子
分担研究課題	先天的恐怖と後天的恐怖の情報統合メカニズム		
キーワード	先天的恐怖、後天的恐怖、情報統合、嗅覚、扁桃体		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	4名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等） 神経機能部門に所属する4名の研究者（伊早坂智子、松尾朋彦、小早川高、小早川令子）が本プロジェクトに必要な分子生物学、免疫組織化学、イメージング、行動学の実験を共同で実施した。</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について） 正常な行動や病態は先天的と後天的なメカニズムで制御される。先天的と後天的な情報が脳内で統合されて行動を制御するメカニズムの多くは未解明である。恐怖情動は強迫性障害、トラウマ、うつ病などの原因となる。本研究では、嗅覚刺激による先天的と後天的な恐怖情報の統合による行動制御という独自のモデルを用いて、この未知のメカニズムを分子レベルで解明することを目指した研究を実施した。</p> <p>後天的な恐怖行動は、あらかじめ電気ショックと関連学習させておいた匂いや音刺激などを提示することで誘発できることが知られている。一方で、先天的な恐怖を効率的に誘発する感覚刺激は未解明であった。げっ歯類の天敵であるキツネの肛門から分泌される 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline (TMT) や、危機に陥ったマウスから分泌される警戒フェロモンとして知られる 2-sec-butyl-2-thiazoline (SBT) はともに、チアゾリン類の骨格を持った揮発性の匂い分子であり、マウスに対して弱い恐怖行動を誘発する活性を持つ。本研究では、これらチアゾリン類匂い分子の化学構造を人工ライブラリーを用いて最適化するという新たな方法で、極めて強力な先天的な恐怖行動の誘発活性を持つ匂い分子「チアゾリン類恐怖臭 (thiazoline-related fear odors: tFOs)」の開発に初めて成功した。tFOs を用いることで、後天的な条件と同等レベルの恐怖行動を先天的に誘発することが可能となった。</p> <p>先天的な恐怖を誘発する tFO と、後天的な恐怖を誘発する匂い分子とをマウスに対して同時に与えた際の相互作用を解析した。その結果、先天的な恐怖刺激の提示は、後天的な恐怖行動を抑制する活性を持ち、この結果、先天的な恐怖行動が後天的な恐怖行動に優先されることが明らかになった。この先天的な恐怖行動の優先原理を司る分子や細胞メカニズムの解明を目指した研究を実施した。</p> <p>先天的と後天的な恐怖行動の統合に関与する脳領域は全脳活性化マッピング法により同定した。先天的と後天的な恐怖刺激は共に扁桃体における神経活動マーカーを上昇させたが、両者の刺激により活性化される亜核には明確な違いが認められた。先天的な恐怖刺激は扁桃体中心核 (CeA) を活性化するのに対して、後天的な恐怖刺激は扁桃体側方核 (LA/BLA) を活性化した。これまで、CeA は後天的な恐怖行動の制御に関与することが知られていたが、先天的な恐怖行動の制御に対する役割は未解明であった。CeA では先天的と後天的な恐怖情報が統合される可能性があるかと推定された。</p> <p>続いて、先天的と後天的な恐怖情報の統合に関与する分子標的を、向精神薬の投与スクリーニング法を用いて探索した。その結果、セロトニン 2A 受容体 (HTR2A) の阻害薬であるリスペリドンやグレマンセリンが、後天的恐怖行動を抑制する一方で、先天的恐怖行動を増悪させるという、逆方向への制御を行うことが明らかになった。この結果は、HTR2A が先天的と後天的恐怖の拮抗的な統合を仲介している可能性を示唆する。本研究では、CeA の HTR2A 発現細胞が先天的と後天的な恐怖の拮抗的で階層的な制御を担う可能性を、自由行動条件での脳深部イメージング法、光遺伝学と薬理遺伝学による行動操作</p>			

などの手法を総合的に用いて検証した。これらの解析の結果、先天性恐怖刺激は CeA-HTR2A 発現細胞の神経活動を抑制するが、この結果、先天性恐怖行動が増強されるとともに、後天的恐怖行動が抑制されることが解明された (Isosaka et al., *Cell* 2015)。

優れた成果があがった点

精神疾患における先天性と後天的な恐怖情動の影響は未解明であった。本研究で嗅覚刺激による先天性と後天的な恐怖情報の統合モデルが確立され、先天性と後天的な恐怖刺激が拮抗的で階層的な関係にあることが初めて解明された。精神疾患を先天性と後天的な側面に分解して診断し、病態の増悪の原因となる情動を特異的に緩和する薬剤を投与するという新たな治療法の適応が求められる。

問題点

現時点では先天性と後天的な恐怖情動を分離して計測する分子マーカーは未解明である。今後は、本研究で開発されたモデルを用いて両者の恐怖情動を計測するマーカーを開発する必要がある。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itoharu S, Kizumi M, Hamana H, Tsuboi A, Hirono H. Supersensitive detection and discrimination of enantiomers by dorsal olfactory receptors: evidence for hierarchical odour coding. *Scientific Reports* レフェリー有 5: 14073. 2015
2. Isosaka T, Matsuo T, Yamaguchi T, Funabiki K, Nakanishi S, Kobayakawa R*, Kobayakawa K*. Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy between innate and learned fear. (* corresponding authors) *Cell* レフェリー有 163, 1153-1164. 2015
3. Sato T, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Emura M, Itoharu S, Kawasaki M, Tsuboi A & Hirono J. Supersensitive odor discrimination is controlled in part by initial transient interactions between the most sensitive dorsal olfactory receptors and G-proteins. *Receptors & Clinical Investigation* レフェリー有 3, e1117. 2016

<図書>主要な図書 5 冊以内

なし

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. Reiko Kobayakawa. Htr2a-Expressing Cells in the Central Amygdala Control the Hierarchy between Innate and Learned Fear. 17th International Symposium Olfaction and Taste (ISOT 2016), Yokohama, June 5-9, 2016.
 2. 小早川高・先天性と後天的な情動の統合処理メカニズム・第9回 Symphony・東京・2016年9月18日
 3. 小早川高・匂いが誘発する恐怖行動と生理応答・第10回メタボロームシンポジウム・鶴岡・2016年10月19日
 4. Ko Kobayakawa. Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy between innate and learned fear. Wiring and Functional Principles of Neural Circuit. San Diego, USA. Nov 17-18, 2016.
- 5
- ・ 山中智子・扁桃体中心核セロトニン 2A 受容体による先天性と後天的な恐怖の階層性制御・第94回日本生理学会大会・浜松・2017年3月28~29日

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	実験病理学講座	事業推進者	上野博夫
分担研究課題	新規遺伝子改変マウスの開発		
キーワード	遺伝子改変マウス、幹細胞、細胞系譜追跡		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	11名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>上野博夫 研究の総括</p> <p>熊野恵城 幹細胞の単離と遺伝子発現解析</p> <p>比舎弘子 幹細胞の培養</p> <p>吉田真子 遺伝子改変マウスの作製</p> <p>厚海奈穂 ターゲティングベクターの構築</p> <p>田中敏弘 成体幹細胞の解析 研究員</p> <p>大町太一 成体幹細胞の解析 大学院生</p> <p>大杉治之 成体幹細胞の解析 大学院生</p> <p>中村尚広 成体幹細胞の解析 大学院生</p> <p>田中聖道 がん幹細胞の解析 大学院生</p> <p>石垣和彦 成体幹細胞の解析 大学院生</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>Cre-loxp システムを用いて幹細胞とその子孫細胞を蛍光タンパク質などのレポーター遺伝子によって標識する細胞系譜追跡法は単細胞レベルで生体外に単離して移植する等の研究手法が使えない成体幹細胞にとって非常に強力かつ有用な研究手法である。しかしながら、現在一般的に行われている方法では、レポーター分子が 1 種類であるために、研究対象組織の幹細胞に非常に特異的なマーカーがあれば有用であるが、そうでない場合には限られた情報しか得ることができなかった。一方フローサイトメトリーを用いた成体幹細胞単離においては、複数の幹細胞マーカーを組み合わせる事で単離する幹細胞の純度を上げることが一般的になっている。今回の研究プロジェクトでは複数の幹細胞マーカーを組み合わせることで細胞を標識する細胞系譜追跡法の新手法の開発に取り組んだ。</p> <p>小腸上皮幹細胞の自己複製における Wnt 経路関連増殖因子のうち、Fzd リガンドの Wnt と Lgr5 リガンドの Rspodin の役割分担について解析した。また、マウスモデルを使って大腸がんにおけるがん幹細胞候補細胞の挙動と起源を明らかとした。また、舌癌においても Bmi1 ががん幹細胞マーカーとして機能することが明らかとした。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>既に上記 2 段階細胞系譜追跡法のコンストラクトを完成し個体化に取り組んでいる。今後作製したマウスの解析を通じて新しい手法の有用性を証明していく。</p>			

問題点

関西医科大学実験動物共同飼育施設において大規模な感染事故が起こったため研究の進行が大幅に遅延した。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. KS Yan, CY Janda, J Chang, GXY Zheng, KA Larkin, VC Luca, LA Chia, AT Mah, A Han, JM Terry, A Ootani, K Roelf, M Lee, J Yuan, X Li, CR Bolen, J Wilhelmy, PS Davies, H Ueno, RJ von Furstenberg, P Belgrader, SB Ziraldo, H Ordonez, SJ Henning, MH Wong, MP Snyder, IL Weissman, AJ Hsueh, TS Mikkelsen, KC Garcia, and CJ Kuo (2017) Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5+ intestinal stem cell self-renewal Nature, in press レフェリー有り

2. Hirotugu Yanai, Naho Atsumi, Toshihiro Tanaka, Naohiro Nakamura, Yoshihiro Komai, Taichi Omachi, Kiyomichi Tanaka, Kazuhiko Ishigaki, Kazuho Saiga, Haruyuki Ohsugi, Yoko Tokuyama, Yuki Imahashi, Shuichi Ohe, Hiroko Hisha, Naoko Yoshida, Keiki Kumano, Masanori Kon and Ueno H. (2017) Intestinal cancer stem cells marked by Bmi1 or Lgr5 expression contribute to tumor propagation via clonal expansion. Scientific Reports, in press レフェリー有り

3. Identification of mouse cochlear progenitors that develop hair and supporting cells in the organ of Corti. Jinshu Xu, Ueno H, Chelsea Xu, Binglai Chen, Irving Weissman, and Pin-Xian Xu 2017 Nature Communications in press

4. T Tanaka, N Atsumi, N Nakamura, H Yanai, Y Komai, T Omachi, K Tanaka, K Ishigaki, K Saiga, H Ohsugi, Y Tokuyama, Y Imahashi, H Hisha, N Yoshida, K Kumano, K Okazaki, and Ueno H. (2016) Bmi1-positive cells in the lingual epithelium could serve as cancer stem cells in tongue cancer. Scientific Reports, doi:10.1038/srep39386 レフェリー有り

5. Ueno H. (2016) Identification of normal and neoplastic stem cells by the multicolor lineage tracing method. Pathology International 2016 ; 66 : 423-430. レフェリー有り

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 主要な図書 5 冊以内
特になし

<学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は匡名と都市名)・発表年月)

主要な発表 5 件以内

1. Ueno H. 「多色系譜追跡法による成体幹細胞の同定と解析」第 25 回日本形成外科学会. 2016. 9.

2. Ueno H. 「多色細胞系譜追跡法による幹細胞・発生研究」 第 15 回日本再生医療学会総会. 大阪 2016. 3.
3. Ueno H. 「Identification of novel stem cells by the multicolor lineage tracing method」(多色細胞系譜追跡法による成体幹細胞の同定) BMB2015 (第 38 回分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸 2015. 12.
4. Ueno H. 「Forefront of tumor microenvironment network research」 第 74 回日本癌学会学術総会. 名古屋 2015. 10.
5. Ueno H. 「新規成体幹細胞の同定とがん化における細胞動態解析」 第 104 回日本病理学会総会. 名古屋 2015. 5.

<特許申請・取得状況>

(出願中) 計 2 件

- 1 出願番号 特願 2013-118652
発明者 上野博夫
発明の名称 食道上皮幹細胞の単離方法
出願人 関西医科大学
出願日 平成 25 年 6 月 5 日 (2013. 6. 5)

- 2 出願番号 特願 2013-118649
発明者 上野博夫
発明の名称 舌上皮幹細胞の単離方法
出願人 関西医科大学
出願日 平成 25 年 6 月 5 日 (2013. 6. 5)

研究成果報告書の概要

講座等名	病理学第二講座	事業推進者	螺良愛郎
分担研究課題	網膜変性症モデルの開発と病態制御ならびに腫瘍モデルによる制御物質の同定		
キーワード	メチルニトロソ尿素、網膜変性症、乳癌、アラキドン酸、ミード酸、クルクミン、緑茶抽出物		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			6名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>螺良愛郎(教授) 実験計画の立案と研究の総括</p> <p>義澤克彦(講師) アラキドン酸の各種疾患への影響</p> <p>坂 貴司(講師) HCGを用いた乳癌抑制の可能性</p> <p>結城美智子(助教) 緑茶抽出物の各種疾患への影響</p> <p>榎本祐子(院生) クルクミンや緑茶抽出物による網膜変性症の制御</p> <p>木下勇一(院生) ミード酸による乳癌制御の可能性</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>アルキル化剤であるメチルニトロソ尿素(MNU)のラットへの単投与は乳腺をはじめ種々の臓器に発癌を促すことにより臓器癌モデルの作出に有用である。また、網膜視細胞にアポトーシスをきたすことより網膜変性症のモデルとなりうる。食品由来の天然産物や体内で合成されるホルモンは各種疾患に対する有効性が証明されれば、毒性が少ないことがみこまれることから、有用な疾患予防／治療物質になりうるということがみこまれる。我々は、脂肪酸のうちアラキドン酸とミード酸、ウコンの黄色欠素であるクルクミン、カテキン類を含む緑茶抽出物、さらにヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)の MNU 誘発疾患モデルに対する病態制御のつき検討した。</p> <p>その結果、アラキドン酸の胎仔期から乳仔期という発育期での投与は、MNU 誘発網膜変性症の軽減に有効であった。なお、アラキドン酸の成熟期動物への投与はこの限りではない。一方、クルクミンや緑茶抽出物の成熟動物への投与は MNU 誘発網膜変性症を軽減した。MNU 誘発乳癌は高率にホルモン依存性であるが、MNU 誘発乳癌の発生をモニターすることにより、妊娠ホルモンのひとつである HCG の投与や n-9 脂肪酸であるミード酸は MNU 乳癌を抑制し、乳癌に対して制癌作用を有することが判明した。歯原性腫瘍は人工作製が困難である。我々は低率ながら MNU により歯原性腫瘍の作製に成功した経験から、現在緑茶抽出物の MNU 誘発歯原性腫瘍に対する影響につき検討中である。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.発育期の網膜変性症に対するアラキドン酸の有効性の証明 2.成熟期の網膜変性症に対するクルクミンや緑茶抽出物の有効性の証明 3.HCG の乳癌抑制効果の実証 4.ミード酸の乳癌抑制効果の実証 			

問題点

1. より効率的な菌原性モデルの開発
2. 抗酸化作用をもつクルクミンや緑茶抽出物の病態制御の機序解明

<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・発行年・ページ)

1. Yoshizawa K, Uehara N, Kimura A, Emoto Y, Kinoshita Y, Yuri T, Takada H, Moriguchi T, Hamazaki T, Tsubura A. Promoting effect of arachidonic acid supplementation on N-methyl-N-nitrosourea-induced pancreatic acinar cell hyperplasia in young Lewis rats. *Oncol Lett* 5(1): 2013, 76-82.
2. Yoshizawa K, Sasaki T, Kuro M, Uehara N, Takada H, Haramura A, Ohara N, Moriguchi T, Tsubura A. Arachidonic acid supplementation during gestational, lactational and post-weaning period rescues retinal degeneration in a rodent model. *Br J Nutr* 109(8): 2013, 1424-1432.
3. Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Kimura A, Uehara N, Yuri T, Tsubura A. Arachidonic acid supplementation does not affect N-methyl-N-nitrosourea-induced renal preneoplastic lesions in young Lewis rats. *Oncol Lett* 5(4): 2013, 1112-1116.
4. Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Yuri T, Tsubura A. N-methyl-N-nitrosourea-induced cerebellar hypoplasia in rats: effect of arachidonic acid supplementation during the gestational, lactational and post-weaning periods. *Exp Ther Med* 6(3): 2013, 627-634.
5. Emoto Y, Yoshizawa K, Uehara N, Kinoshita Y, Yuri T, Shikata N, Tsubura A. Curcumin suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in Sprague-Dawley rats. *In Vivo* 27(5): 2013, 583-590.
6. Yuri T, Kinoshita Y, Emoto Y, Yoshizawa K, Tsubura A. Human chorionic gonadotropin suppresses human breast cancer cell growth directly via p53-mediated mitochondrial apoptotic pathway and indirectly via ovarian steroid secretion. *Anticancer Res* 34(3): 2014, 1347-1354.
7. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Yoshikawa Y, Sayama K, Tsubura A. Green tea extract-induced acute hepatotoxicity in rats and a literature review. *J Toxicol Pathol* (印刷中).
8. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuri T, Yuki M, Sayama K, Shikata N, Tsubura A. Green tea extract suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in Sprague-Dawley rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (印刷中).
9. Kinoshita Y, Yoshizawa K, Hamazaki K, Emoto Y, Yuri T, Yuki M, Shikata N, Kawashima H, Tsubura A. Mead acid inhibits the growth of KPL-1 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol Rep* (印刷中).

※上記論文全てレフェリー有

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数)

1. Tsubura A, Yoshizawa K, Kuro M. N-Methyl-N-nitrosourea animal models for retinitis pigmentosa, In: *Animal Models for the Study of Human Disease*. Conn PM Ed., Academic Press / Elsevier, Oxford, 2013, p.117-142.

<学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は匡名と都市名)・発表年月)

1. 込 貴司, 頼 彦長, 木村彩子, 佐々木朋, 木下勇一, 義澤克彦, 螺良愛郎. Growth

inhibitory mechanisms of human chorionic gonadotropin on MNU-induced female rat mammary carcinoma. (日病会誌 101: 409, 2012) 第 101 回日本病理学会 東京 4 月, 2012.

2. 義澤克彦, 佐々木朋, 木村彩子, 三城弥範, 木下勇一, 上原範久, 垾 貴司, 守口 徹, 螺良愛郎. アラキドン酸の妊娠期・授乳期投与による MNU 誘発ラット乳癌発生への影響. (日病会誌 101: 409, 2012) 第 101 回日本病理学会 東京 4 月, 2012.

3. 義澤克彦, 上原範久, 榎本祐子, 木下勇一, 守口 徹, 浜崎智仁, 螺良愛郎. N-methyl-N-nitrosourea 誘発ラット膵臓腺房過形成: その特徴とアラキドン酸投与によるプロモーション効果. (抄録集: 198, 2012) 第 154 回日本獣医学会 盛岡 9 月, 2012.

4. 垾 貴司, 榎本祐子, 木村彩子, 木下勇一, 義澤克彦, 螺良愛郎. 妊娠に関連するホルモンによる乳癌治療の可能性: hCG によるヒト乳癌細胞株の増殖抑制効果. (日病会誌 102: 365, 2013) 第 102 回日本病理学会 札幌 6 月, 2013.

5. 木下勇一, 義澤克彦, 榎本祐子, 木村彩子, 上原範久, 垾 貴司, 河島 洋, 浜崎 景, 浜崎智仁, 螺良愛郎. KPL-1 ヒト乳癌細胞株移植ヌードマウスを用いたミード酸の抗腫瘍効果の検討. (日病会誌 102: 365, 2013) 第 102 回日本病理学会 札幌 6 月, 2013.

6. 榎本祐子, 義澤克彦, 木村彩子, 木下勇一, 垾 貴司, 四方伸明, 螺良愛郎. MNU 誘発ラット網膜色素変性症モデルに対するクルクミンの有用性. (日病会誌 102: 360, 2013) 第 102 回日本病理学会 札幌 6 月, 2013.

7. 垾 貴司, 木下勇一, 榎本祐子, 義澤克彦, 螺良愛郎. 実験モデルを用いたヒト絨毛性ゴナドトロピンの乳癌治療効果に関する検討. (抄録集: 20, 2013) 第 22 回乳癌基礎研究会 津 7 月, 2013.

8. 木下勇一, 義澤克彦, 榎本祐子, 垾 貴司, 螺良愛郎. ヒト KPL-1 乳癌細胞移植雌ヌードマウスに対するエイコサトリエン酸の腫瘍増殖抑制効果. (抄録集: 19, 2013) 第 22 回乳癌基礎研究会 津 7 月, 2013.

9. 榎本祐子, 義澤克彦, 木下勇一, 垾 貴司, 吉川 豊, 茶山和敏, 螺良愛郎. 緑茶抽出物誘発のラット肝臓毒性の特徴. (要旨集: 86, 2014) 第 30 回日本毒性病理学会 徳島 1 月, 2014.

10. 木下勇一, 鈴木麻友香, 四方伸明, 垾 貴司, 螺良愛郎, 鷹巣晃昌. 胸水細胞診にて横紋筋肉腫成分を認めた子宮体部原発異所性癌肉腫の 1 例. (抄録集: 18-19, 2014) 第 39 回日本臨床細胞学会大阪府支部学術集会 大阪 3 月, 2014.

11. 義澤克彦, 榎本祐子, 木下勇一, 垾 貴司, 結城美智子, 吉川 豊, 茶山和敏, 螺良愛郎. 緑茶抽出物によるラット肝臓毒性. (日病会誌 103(1): 303, 2014) 第 103 回日本病理学会 広島 4 月, 2014.

12. 木下勇一, 義澤克彦, 榎本祐子, 結城美智子, 垾 貴司, 螺良愛郎. KPL-1 ヒト乳癌細胞株に対するミード酸の腫瘍抑制効果. (抄録集: 21, 2014) 第 23 回乳癌基礎研究会 つくば 7 月, 2014.

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	モデル動物部門	事業推進者	李 成一
分担研究課題	疾患モデルマウス作製方法の開発		
キーワード	遺伝子改変マウス、ES 細胞、CRISPR/Cas9、体外成熟卵子		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			2名
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）			
<p>李成一（准教授） 遺伝子改変マウスの作製および解析 小澤まどか（助教） 遺伝子改変マウスの作製および解析（平成 24 年～平成 25 年） 西村愛美（助教） 遺伝子改変マウスの作製および解析（平成 26 年～ ）</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>私たちは、リンパ球のインテグリン活性化の制御に関わる分子について解析を行う為の遺伝子改変マウスの作製を主に行ってきた。24 年度から現在までに、14 系統の ES 細胞を樹立し、この ES 細胞を 8 細胞期胚に移植することでキメラマウスの作製を試みた。その内の 10 系統はキメラマウスの作製に成功した。さらに、作製したキメラマウスの 7 系統で、生殖系列にのる遺伝子改変マウスの作製に成功した。作製した遺伝子改変マウスの生産効率を高めるための技術として、3 週齢雌マウスを使用した体外受精によって、自然交配よりも早いサイクルでの産子獲得や、麻酔処置後に生存したまま片側の精巣上体尾部を採取する事で貴重なマウスを残したままの体外受精が可能であった。また、26 年度からは CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた K0 マウスの作成にも着手し、シグナル誘導増殖関連遺伝子である Sip1 の K0 マウス作製を行った。CRISPR/Cas9 では PX330 plasmid を用いた前核注入法を採用し、前核注入後の生存成績は 49/54 (90%)、生存前核卵子と 2 細胞期まで発生した胚を移植した結果、11/40 (28%) が産子として得られ、その内の 3 匹は数塩基～数百塩基の欠損を認めた。また同遺伝子の別欠損部位に関しても同様に生存成績 48/60 (80%)、4/38 (11%) の産子が得られ、内 1 匹に 1 塩基の挿入が認められた。これら作製した F0 マウスの殆どは遺伝子情報がモザイクになっており、実験に供試するには変異を固定するために WT マウスとの交配が不可欠であることが明らかになった。また、多様な疾患モデルマウスの中には、排卵障害を持つものも存在しており、卵巣からの未成熟卵子を体外で受精可能な卵子まで発生させる体外成熟技術を用いた体外受精に関しても研究を進めている。しかしながら、体外成熟培地の確立が不完全な上、体外成熟由来の胚は、胚盤胞期胚および産子への発生成績は未だ低率であることから、体外成熟時の培地の調整による発生成績の改善を行っており、β-Nicotinamide mononucleotide または L-carnitine の添加により胚盤胞期への発生成績の向上が確認され、これらの添加が発生段階でどのように寄与しているのか検討中である。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ ES 細胞内からのキメラマウス作出効率の向上、および作製したキメラ系統の 7 割は生殖系列への分化が確認された。 ○ CRISPR/Cas9 による K0 マウスの作成技術を確立した。 ○ 生体を残したまま体外受精を行う技術の本施設でも確立できた。 			
<p>問題点 特になし</p>			

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Ueda Y, Kondo N, Ozawa M, Yasuda K, Tomiyama T, Kinashi T, Sema3e/Plexin D1 Modulates Immunological Synapse and Migration of Thymocytes by Rap1 Inhibition. *J Immunol*. レフェリー有. 196(7):3019-31. (2016).
2. Yasuda K., Ueda Y., Ozawa M., Matsuda T., Kinashi T., Enhanced cytotoxic T cell function and inhibition of tumor progression by Mst1 deficiency. *FEBS Letter*. レフェリー有. 590(1):68-75. (2016) doi: 10.1002/1873-3468.12045.
3. 安齋政幸、井上達也、西村愛美、野田義博、東里香、梶本みずき、三谷匡、細井美彦. β -Nicotinamide mononucleotide を添加したマウス体外成熟培地が未成熟卵子内への活性酸素種 (ROS) に与える影響. *日本受精着床学会雑誌*. レフェリー有. 33:21-26.2016.
4. 井上達也、東里香、野田義博、西村愛美、梶本みずき、小橋朱里、折杉卓哉、安齋政幸. L-カルニチン添加体外成熟培地がマウス卵子細胞質内活性酸素種に与える影響. *近畿大学先端技術総合研究所紀要*. レフェリー有. 21:49~56.
5. Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Etoh K, Fukuda M, Kinashi T, Katagiri K. Rab13 acts downstream of the kinase Mst1 to deliver the integrin LFA-1 to the cell surface for lymphocyte trafficking. *Sci. Signal*. レフェリー有. 7:ra72 (2014) DOI: 10.1126/scisignal.2005199

<図書>主要な図書 5 冊以内

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. 小橋朱里、東里香、折杉卓哉、西村愛美、中川隆生、小笠原里奈、小木曾力、鷺津朱理、細井美彦、安齋政幸. マウス GV 期卵子の体外成熟中における外因性 L-カルニチンの影響. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 1 日.
2. Ueda Y., Kondo N., Ozawa M., and Kinashi T., Visualization of Rap1 activation during thymocyte development within the thymic tissues by 2-photon microscopy, International Symposium on Multi-dimensional Fluorescence Live Imaging of Cellular Functions and Molecular Activities, Kyoto, Jan 26th–28th.
3. Ueda Y., Kondo N., Ozawa M., Katakai T., and Kinashi T., SEMA3E/Plexin D1 axis controls thymocyte adhesion and polarization by modulating the Rap1 signaling pathway. 第 43 回免疫学会学術集会、京都、2014 年 12 月 10 日~12 日.
4. Ozawa M., Ueda Y, Lee SI, Katakai T and Kinashi T. Roles of Rap1 signaling in dendritic cells migration. 日本免疫学会学術集会、神戸、2012 年 12 月 5 日~7 日.
5. Ozawa M., Katakai T, Ueda Y, Lee SI and Kinashi T. Crucial roles of Mst1 for antigen recognition during T cell-APC interaction. 日本免疫学会学術集会、幕張、2013 年 12 月 11 日~13 日.

<特許申請・取得状況>

研究成果報告書の概要

講座等名	解剖学第一講座	事業推進者	山田久夫
分担研究課題	グリア・ニューロン相関を解析するモデル		
キーワード	グリア細胞、ニューロン、相関、細胞新生、細胞更新、髄鞘		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	9名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>山田久夫（教授） 研究の総括</p> <p>若林毅俊（准教授⇒非常勤講師） ニューロン死の解析</p> <p>森徹自（講師⇒准教授⇒非常勤講師） 新生ニューロンの細胞周期</p> <p>田中進（講師） 神経内分泌系の疾患モデル</p> <p>平原幸恵（助教） 脱髄と髄鞘形成因子の解析</p> <p>大江総一（助教） 脳虚血モデルを用いた解析</p> <p>高森康晴（助教⇒研究員） 神経系細胞分化と核膜タンパク質の解析</p> <p>小池太郎（大学院生⇒ポスドク⇒助教） 脊髄後根神経節における細胞動態の解析</p> <p>滝澤奈恵（大学院生） 副腎の自家移植モデル</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>中枢神経系の細胞系譜では、幹細胞からニューロンとマクログリア（希突起膠細胞と星状膠細胞）が生まれ、末梢神経系では神経堤由来の細胞系譜をとる。髄鞘を形成する細胞は中枢神経系では希突起膠細胞であり、末梢神経系ではシュワン細胞である。</p> <p>1) 硫酸化糖脂質欠損マウスおよびクプリゾン誘発性脱髄疾患モデルに関する研究</p> <p>希突起膠細胞の増殖にエストロゲンが関与する事や、エストロゲンの膜レセプター（G タンパク質結合型受容体 30 ; GPR30）が in vivo の系で希突起膠細胞分化過程の全段階で発現していることは報告されていた。そこで、cuprizone 投与で脱髄を起こさせた多発性硬化症モデル動物ラットを作出し、髄鞘形成各期において GPR30 のアゴニスト G1 などの薬剤投与をおこない、分化マーカーを用いて免疫組織化学をおこなった。また、脊髄後根神経節ニューロンと希突起膠細胞初代培養系との共培養においても確認した。その結果、GPR30 を介して希突起膠細胞の分化成熟および髄鞘形成が促されることを突き止めた。すなわちエストロゲンの希突起膠細胞に対する作用を明らかにした。</p> <p>脊髄後根神経節では、神経節細胞およびそこから出た突起を被う末梢のグリア細胞の特質を明らかにするとともに、その細胞動態や細胞亜種分類を試みた。その結果、未分化な指標とされてきた Sox2 が成熟した細胞群にも存在し新たな機能が推察された。また、後根神経節のグリア細胞の亜種分類をおこなったほか、グリア細胞の「増殖帯」についても判明した。</p> <p>これらの結果は、多発性硬化症、ギランバレー症候群、希突起グリア腫、神経鞘腫の発症メカニズム解析や治療法開発に向けた基礎的データである。</p> <p>2) マウス中大脳動脈閉塞モデル</p> <p>マウス側頭骨部切開により中大脳動脈に到達、この動脈を焼灼して片側終脳永久脳梗塞モデル動物を作出した。脳梗塞発症後のニューロン-グリア相関、とりわけそのクロストークに関与する因子について研究をおこなった。新規的発見として、ニュー</p>			

ーロステロイドの一種である胆汁酸が梗塞部位に集積する事を見出した。

優れた成果があがった点

問題点

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Hirahara Y, Wakabayashi T, Mori T, Koike T, Yao I, Tsuda M, Honke K, Gotoh H, Ono K, Yamada H.

Sulfatide species with various fatty acid chains in oligodendrocytes at different developmental stages determined by imaging mass spectrometry.

J Neurochem レフェリー有 140(3): 435-450, 2017.

2. Tanaka S, Takizawa N, Honda Y, Koike T, Oe S, Toyoda H, Kodama T, Yamada H

Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response.

Brain Behav Immun レフェリー有 57: 58-67, 2016.

3. Takizawa N, Matsuzaki T, Yamamoto T, Mishima T, Miyasaka C, Tanaka S, Kinoshita H, Uemura Y, Yamada H, Matsuda T

Novel strategy for cystitis glandularis: Oral treatment with cyclooxygenase-2 inhibitor.

Int J Urol レフェリー有 23: 706-708, 2016.

4. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Takamori Y, Hirahara Y, Yamada H

Sox2 in the adult rat sensory nervous system.

Histochem Cell Biol レフェリー有 141(3): 301-309, 2014.

5. Mori T, Wakabayashi T, Ogawa H, Hirahara Y, Koike T, Yamada H

Increased histone h3 phosphorylation in neurons in specific brain structures after induction of status epilepticus in mice.

PLoS ONE レフェリー有 8(10): Article No.e77710, 2013.

6. Hirahara Y, Matsuda KI, Yamada H, Saitou A, Morisaki S, Takanami K, Boggs JM, Kawata M.

G protein-coupled receptor 30 contributes to improved remyelination after cuprizone-induced demyelination. *Glia* レフェリー有 61(3):420-431 2013

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 主要な図書 5 冊以内

森徹自, 山田久夫

「細胞系譜追跡の組織化学」 中西印刷・組織細胞化学 2014・2014年, pp 175-187

<学会発表> 主要な発表 5 件以内

1. 山田久夫

組織化学の進化とともに歩んだ 35 年を振り返って

第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 大阪・枚方市 2015 年 10 月

2. 平原幸恵

モノクローナル抗体 04 のエピトープに迫る

第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 大阪・枚方市 2015 年 10 月

3. Mori T, Wakabayashi T, Hirahara Y, Takamori Y, Koike T, Yamada H

Chromatin remodeling in neurons in the caudate-putamen after excessive neuronal excitation.

Society Neuroscience 43rd Annual Meeting, San Diego, CA-USA, 2013 年 11 月

4. Koike T, Wakabayashi T, Mori T, Hirahara Y, Takamori Y, Yamada H

Identification of Sox2-positive cells in somato-sensory nervous system

Society Neuroscience 43rd Annual Meeting, San Diego, CA-USA, 2013 年 11 月

5. Kurebayashi S, Mori T, Wakabayashi T, Koike T, Yamada H

Ascending exercise increases neurogenesis in the dentate gyrus of adult mouse.

Society Neuroscience 43rd Annual Meeting, San Diego, CA-USA, 2013 年 11 月

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	解剖学第2講座	事業推進者	杉本哲夫
分担研究課題	iPS細胞療法の基礎研究		
キーワード	iPS細胞の分化、神経幹細胞の純化、 <i>piggyBac</i> トランスポゾン、薬剤選択		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	6名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>丸山正人、講師、構想、iPS細胞の分化、リアルタイムPCR、immunoblotting、イメージング、データ解析 中野洋輔、助教、mRNA検出 山下雄司、大学院生、immunostaining、イメージング 加瀬政彦、講師、mRNA検出 西村拓也、医学部学生、研究医養成コース、リアルタイムPCR 杉本哲夫、教授、構想、総括</p>			
<p>研究成果の概要（平成24～28年度の研究成果について）</p> <p>(1) 神経系由来の細胞をもとに樹立したiPS細胞の未分化性及び多分化能について検討した。Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lyn28の5つのリプログラミング遺伝子をコードしたトランスポゾンベクターを用いて、マウス由来神経上皮細胞(NE4C)からiPS細胞へのリプログラミングを行った。樹立したiPS-NE4C細胞はSSEA1由来の強い蛍光シグナルを発し、未分化性を有することが示された。さらに、iPS-NE4C細胞を分化させ、三胚葉バイオマーカーを用いて発現を調べたところ、三胚葉系への多分化能を有することが示された。</p> <p>(2) 中枢神経系は、再生能力が低いことが知られているため、iPS細胞療法の重要なターゲットとなる。一方で、分化させたiPS細胞には、多くの細胞種が混在するため、目的となるターゲット細胞を純化する方法が必須である。そこで我々は、神経幹細胞特異的に薬剤耐性遺伝子を発現するiPS安定発現細胞を樹立し、分化させたiPS細胞を薬剤選択することで、神経幹細胞を簡便に純化させる方法を考えた。神経幹細胞特異的エンハンサーとして知られているNestin遺伝子のイントロン領域に着目し、本領域の下流でBlasticidin S耐性遺伝子及びDsRedを発現するiPS安定発現細胞を樹立した。<i>piggyBac</i>トランスポゾンを用いることで、iPS安定発現細胞を効率よく樹立できることが示された。樹立した細胞に対して、三胚葉バイオマーカーと神経系分化バイオマーカーを用いてリアルタイムPCR法による発現解析を実施した。これらの結果、Blasticidin S処理により純化させたiPS細胞由来のNestin陽性細胞は、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化能を有する神経幹細胞であることが示された。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>iPS細胞からターゲット細胞を得るための方法の1つとして、薬剤選択を利用した方法が有用であることが示された。また、構築したコンストラクトのプロモーター及びエンハンサー領域を、他の細胞系譜特異的なプロモーターやエンハンサーに置換することで、本法</p>			

を神経幹細胞以外の細胞種を純化する方法にも応用できることが示唆された。

問題点

特になし

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Trifonov S, Yamashita Y, Kase M, Maruyama M, Sugimoto T. Overview and assessment of the histochemical methods and reagents for the detection of β -galactosidase activity in transgenic animals. *Anatomical Science International*. レフェリー有 91 (1):56-67.2016
2. Trifonov S, Yamashita Y, Kase M, Maruyama M, Sugimoto T. Glutamic acid decarboxylase 1 alternative splicing isoforms: characterization, expression and quantification in the mouse brain. *BMC Neuroscience*. レフェリー有 15(1):Article No. 114.2014
3. Maruyama M, Yamashita Y, Kase M, Trifonov S, Sugimoto T. Lineage-Specific Purification of Neural Stem/Progenitor Cells From Differentiated Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*. レフェリー有 2 (6):420-433.2013
4. Trifonov S, Houtani T, Kase M, Toida K, Maruyama M, Yamashita Y, Shimizu J, Sugimoto T. Lateral regions of the rodent striatum reveal elevated glutamate decarboxylase 1 mRNA expression in medium-sized projection neurons. *Eur. J. Neurosci*. レフェリー有 35(5):711-722.2012
5. Horie A, Fujiwara H, Sato Y, Suginami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I, Hattori A. Laeverin/aminopeptidase Q induces trophoblast invasion during human early placentation. *Human Reproduction*. レフェリー有 27 (5):1267-1276.2012

<図書>主要な図書 5 冊以内

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. 丸山正人, 山下雄司, Trifonov Stefan, 加瀬政彦, 杉本哲夫. 神経幹細胞特異的に発現させた薬剤耐性遺伝子によるマウス iPS 細胞由来神経幹細胞の純化. 日本薬学会第 133 年会. 横浜. 2013. 3.

<特許申請・取得状況>

研究成果報告書の概要

講座等名	生理学第二講座	事業推進者	中村加枝
分担研究課題	脳内神経伝達物質の破綻による疾患モデルの作成と評価		
キーワード	セロトニン 光遺伝学 背側縫線核 サル		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	3名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）	生理学第二講座 教授 中村加枝 実験の遂行と解析 同 講師 上田康雅 実験の遂行と解析 同 講師 安田正治 実験の遂行と解析		
研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）	<p>セロトニンは精神神経疾患の治療薬にもその作用薬が多く、情動や意思決定などに影響を及ぼす神経メカニズムの同定は重要である。脳幹の背側縫線核にはセロトニン細胞が多く存在するが、GABA、ドパミン、ノルアドレナリン細胞なども存在するため、セロトニン固有の機能と結びつけることが困難である。さらに、背側縫線核のセロトニン細胞のみを選択して興奮・抑制をして行動の変化を計測し、その機能を明らかにするという因果関係を明らかにすることも重要であるが、セロトニン受容体は非特異的に様々な細胞に分布しているため細胞種・回路特異的な興奮・抑制は望めない。昨今、げっ歯類ではウイルスベクターを用いて細胞に選択的に DREADD やチャンネルロドプシンを発現させ、セロトニン細胞のみを選択的に機能促進・抑制する方法が一般的になってきた。しかし、霊長類においては適切なウイルスベクターは開発されていない。ヒトの病態解明や治療を目指すためには、脳構造が似ている霊長類の検討が欠かせない。</p> <p>本研究では京都大学薬理学講座 永安一樹博士の作成したウイルスベクターを、一頭のカニクイサル背側縫線核に接種し、その発現効率や拡散の程度を確認した。まず、サル（カニクイザル、オス 6kg）の背側縫線核の位置を、MRI 画像及び電気生理学的に同定した。位置を確認した背側縫線核に、金属電極を装着した微細な金属チューブを神経活動を記録しながら刺入し、ウイルスベクターを注入した。ウイルスベクターとしては、サル TPH2 遺伝子上流配列の下流で ChR2 遺伝子（クラミドモナス由来）および eYFP 遺伝子（オワンクラゲ由来）を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを用いた。</p> <p>その結果、注入部位および投射部位において光刺激にも十分反応することが明らかになった。</p>		
優れた成果があがった点	サルにおけるセロトニン細胞選択的な光遺伝学的実験は他では報告がない。本研究による病態動物の創成は謎の多いセロトニンの機能の解明のために重要なステップとなる。また、京都大・北海道大の研究グループとの共同研究として進めることもできた。		

問題点

霊長類の光遺伝学的アプローチは現在始まったばかりであり、技術的に試行錯誤が必要である。本研究においても、今後ノイズの除去、適切なウイルス濃度の決定など解決すべき点が残されている。

また、本研究で得られた動物モデルによる行動変化の検討を今後継続する予定である。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Balasubraman P, Chakravarthy S, Wong-Lin K, Wang D, Cohen J Y, Nakamura K, and Moustafa A, Neural circuit models of serotonergic system: From microcircuits to cognition. In A. Moustafa (Ed.) Computational models of Brain and Behavior. Wiley-Blackwell. In press. 2017
2. Wong-Lin K, Wang D, Moustafa A, Cohen J. and Nakamura K, "Toward a multiscale modeling framework for understanding serotonergic function" in its current form for publication in the Journal of Psychopharmacology. In press 2017
3. Yamada H, Inokawa H, Hori Y, Pan X, Matsuzaki R, Nakamura K, Samejima K, Shidara M, Kimura M, Sakagami M, Minamimoto T, Characteristics of fast-spiking neurons in the striatum of behaving monkeys. Neurosci Res. 105:2-18. 2016
4. 中村加枝 林和子 中尾和子 背側縫線核による報酬・嫌悪情報処理 日本薬理学雑誌 vol149 2017

<図書>主要な図書 5 冊以内

なし

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. 中村加枝 背側縫線核による報酬・嫌悪情報処理 第 89 回日本薬理学会 シンポジウム 招待講演 (横浜) 2016 年 3 月
2. Ueda Y, Yasuda M and Nakamura K; "サル意思決定、自律神経反応および線条体尾状核の情報処理に嫌悪刺激の存在が与える影響" 第 39 回日本神経科学大会 (横浜) 2016 年 7 月
3. 安田 正治, 中村 加枝, 「感情が学習に与える影響についての生理学的解析」 第 39 回日本神経科学大会 (横浜) 2016 年 7 月
4. Ueda Y, Yasuda M, Nakamura K; "Different population of primate caudate neurons is involved in decision making under different emotional context." Annual meeting of Society for neuroscience (San Diego, USA) Nov 2016

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	生物学教室	事業推進者	平野 伸二
分担研究課題	自閉症におけるプロトカドヘリンの役割		
キーワード	プロトカドヘリン、自閉症		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	4 名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>平野と佐藤助教が中心的に進めている（平野が行動解析、組織化学的解析などを担当し、佐藤が組織化学的解析）。また、岡野も平野の解析等に協力している。研究医養成コースの林崎は組織化学的解析をしている。また、学内では病理学第2講座、学外では理化学研究所、東京医科歯科大学、米国アイオワ大学等とも共同研究を行っている。</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>まず、自閉症関連遺伝子であるプロトカドヘリン9のノックアウトマウスの行動解析を理化学研究所若菜成晴博士と共同研究を行い、このマウスが新奇物体を避ける傾向にあるなど情動が行動に異常があることがわかった（未発表）。一方、一般組織学的な解析では異常が見られなかったことから、この分子が神経系で何らかの機能を担っていることが推測された。また、理化学研究所永雄総一博士との共同研究により視機性眼球反応に異常があることも分かった（未発表）。そこで、これらの異常の原因部位や細胞を同定するために理化学研究所との共同研究でプロトカドヘリン9のコンディショナルマウスの作製にとりかかった。これまでに Floxed マウスを作製できたので、今後コンディショナルノックアウトを用いて解析を進める予定である。</p> <p>また、内耳におけるプロトカドヘリン9の局在を調べたところ、平衡斑の有毛細胞と内耳神経の接着部位に局在していることがわかった。（未発表）</p> <p>プロトカドヘリン1のノックアウトマウスの行動解析を理化学研究所若菜成晴博士と共同研究を行い、このマウスが他個体への接触が上昇し、社会性行動に異常あることがわかった。（未発表）</p> <p>自閉症関連遺伝子であるプロトカドヘリン10のノックアウトマウスの行動解析については、共同研究をしている米国 Edward Brodtkin 博士のグループが中心となって行われた。そのヘテロマウスでは、雄特異的に社会性行動が低下していた。扁桃体ニューロンにおいてスパインの密度が上昇しているなど扁桃体の神経回路の異常が原因であると推測された。（Schoch et al. 2017）</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>プロトカドヘリン1、9、10のノックアウトマウスまたはヘテロマウスで、行動異常が観察され、これらの分子群が、社会性や情動系の行動に関わっていることが明らかになった。</p>			
<p>問題点</p>			

プロトカドヘリン9のノックアウトマウスの表現型とヒトの自閉症の症状との関連性の評価はまだである。プロトカドヘリン9の発現が生体ではなくなり、観察された行動異常の原因が細胞レベルで説明できていない点は今後の課題である。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

Schoch H, Kreibich AS, Ferri SL, White RS, Bohorquez D, Banerjee A, Port RG, Dow HC, Cordero L, Pallathra AA, Kim H, Li H, Bilker WB, Hirano S, Schultz RT, Borgmann-Winter K, Hahn CG, Feldmeyer D, Carlson GC, Abel T, Brodtkin ES. Sociability Deficits and Altered Amygdala Circuits in Mice Lacking Pcdh10, an Autism Associated Gene. *Biol Psychiatry*. レフェリー有 2017 81(3):193-202

<図書>主要な図書 5 冊以内

1 Suzuki ST & Hirano S, Chapter 1 Introduction. In "*The Cadherin Superfamily - Key Regulators of Animal Development and Physiology*" (Suzuki ST & Hirano S Eds.), pp3-11. Springer, Tokyo 2016 (部分執筆)

2 Imai-Okano K & Hirano S, Chapter 11 Various atypical CAdherins: T-cadherin, RET, Calsyntenin, and 7D-cadherin. In "*The Cadherin Superfamily - Key Regulators of Animal Development and Physiology*" pp277-311. (Suzuki ST & Hirano S Eds.), Springer, Tokyo 2016 (部分執筆)

3 Hirano S, and Imai-Okano K, Chapter 15. Cadherin-related diseases. In "*The Cadherin Superfamily - Key Regulators of Animal Development and Physiology*" (Suzuki ST & Hirano S Eds.), pp399-421. Springer, Tokyo 2016 (部分執筆)

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. Suteera Vibulyaseck, Gideon Sarpong, Hirofumi Fujita, Shinji Hirano, Izumi Sugihara. Early development of the longitudinal striped compartments in the prenatal mouse cerebellum studied with three-dimensional mapping of protocadherin 10 expression. 第 39 回 日本神経科学大会 7月 20-22 日パシフィコ横浜 P3-019 7月 22 日 2016

2. Gideon Anokye Sarpong, Hirofumi Fujita, Suteera Vibulyaseck, Teiichi Furuichi, Shinji Hirano, Izumi Sugihara, Comparison of expression patterns of different marker molecules of the cerebellar longitudinal striped compartments in the mouse. 第 39 回 日本神経科学大会 7月 20-22 日パシフィコ横浜 P3-153 7月 22 日 2016

3. Koji Oishi, Nao Nakagawa, Kashiko Tachikawa, Shinji Sasaki, Michihiko Aramaki, Shinji Hirano, Nobuhiko Yamamoto, Yumiko Yoshimura, and Kazunori Nakajima (presenter: K. Nakajima), "Identity of neocortical layer 4 neurons is specified through correct positioning into the cerebral cortex" 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN2016), Palais des Congrès d'Antibes Juan les Pins, Antibes-Juan les Pins, France, 2016 (poster)

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	公衆衛生学講座	事業推進者	神田靖士
分担研究課題	疾患モデル動物における再生医療の応用と高度不飽和脂肪酸の生活習慣病予防と治療		
キーワード	組織幹細胞、加齢性難聴、高度不飽和脂肪酸、リン脂質、骨粗鬆症、漢方薬		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			6名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>西山利正 教授 研究の統括</p> <p>神田靖士 准教授 大学院生などの研究指導並びに下垂体幹細胞の特徴付けと遺伝子発現の解析</p> <p>下笠敬紀 助教 下垂体幹細胞の特徴付け（細胞培養とシーケンス解析）</p> <p>大岡 久司 研究員 内耳の聴覚伝導路（特に下丘）における組織幹細胞、SP 細胞の採取</p> <p>岡崎はるか 研究員 内耳の聴覚伝導路（特に下丘）における組織幹細胞の探索</p> <p>王 澤蘊 研究員 漢方薬のエストロゲン活性の測定</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p><u>下丘における加齢にともなう GluN1 遺伝子の発現制御</u></p> <p>C57BL/6J マウスの下丘において、加齢性難聴に関係すると考えられる遺伝子発現変化を cDNA microarray を用いて解析した。その結果を Real time PCR を用いて追証し、middle-aged 群での NMDA receptor subunit $\zeta 1$ (GluN1) 遺伝子の著明な発現低下を認めた。さらに GluN1 遺伝子については、young 群と middle-aged 群の組織中の発現を in situ hybridization を用いて比較した結果、young 群と比較して middle-aged 群では陽性細胞数が減少していることを認めた。さらに下丘を DCIC, CIC, ECID の 3 つの領域に分けその領域中の GluN1 陽性細胞数を定量的に比較したところ、middle-aged 群では young 群と比してそれぞれの領域において GluN1 陽性細胞の有意な減少が観察された。</p> <p><u>不飽和脂肪酸の肝臓及び脳へ与える影響の検討</u></p> <p>ドコサヘキサエン酸 (DHA) は、トリアシルグリセロールに結合した化学形態より、リン脂質に結合した化学形態の方が生体内への吸収率が良いことが知られている。DHA 結合リゾフォスファチジルコリン (DHA-LPC) は、血液脳関門を通過できる脳への DHA 供給化学形態であることが報告された (Nguyen et al., Nature, 2014)。本研究では、DHA-LPC 摂取が生体内の脂肪酸組成に及ぼす影響を評価することを目的に、4 週齢 Wistar 系雄ラットを用い、AIN93G (大豆油 7%) 給餌群を Control 群として、魚油 TG 群 (大豆油 4.5%+TG 型魚油 2.5%)、LPC 群 (大豆油 4.5%+LPC2.5%) の 3 群を設定し検討した。28 日後、LPC 群で Control 群に比較し、肝臓の中性脂質およびコレステロール濃度の有意な低下がみられた。これにより DHA-LPC 摂取は血清および肝臓の中</p>			

性脂質とコレステロール濃度の低下や血清中の DHA 含量を増加させるが、脳の DHA 濃度には影響しないことが示唆された。

更年期障害に用いられる漢方薬のエストロゲン活性の検討

婦人科で更年期障害に対して処方される漢方薬の薬効機序を解明する目的で1つの候補であるエストロゲンに着目した。5種類の漢方薬を用いて酵母 Twohybrid 法にてエストロゲン α 、 β 活性をそれぞれ測定した結果、温経湯、女神散、加味逍遥散は β 型エストロゲン活性を有することが明らかとなった。また、 α 活性はほとんど認められなかった。また、それぞれの漢方製剤に含有される生薬の β 型エストロゲン活性を検討した結果、その結果、3種類の漢方製剤の共通生薬であるカンゾウにおいて最も高い活性が検出された。温経湯に含有されるカンゾウとゴシュユ、ゴシュユとケイヒの組み合わせによる相乗効果が検出された。また、女神散においてはチョウジとカンゾウの組み合わせによって相乗効果が検出された。今後、骨粗しょう症モデルマウスを作成し、これらの漢方製剤及び生薬の治療及び予防効果を検討していく予定である。

優れた成果があがった点

加齢性難聴が glutamate receptor GluR7 遺伝子の発現低下と関係することは報告されているが、加齢性難聴と GluN1 の発現低下に関する報告はいまだなされていない。本研究によりグルタミン酸の神経毒性が中枢聴覚路でのシナプスにおける神経可塑性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

問題点

漢方の研究において生薬にはエストロゲン活性を有するものが有り、その組み合わせにより相乗効果を示すことが示唆されたが、生薬には多くの成分が存在するため活性を有する成分の特定には至っていない。今後、HPLC などの手法を用いて解析することが求められる。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. 王 澤蘊、神田靖士、下埜敬紀、ヴィエンバリー フォンマニ-ボン、西山利正、ラット下垂体腫瘍細胞 MtT/Se を用いた漢方製剤のエストロゲン様作用の検討、産婦人科 漢方研究のあゆみ、査読有 33:36~39. 2016. 4
2. Hosomi R, Otsuka R, Arai H, Kanda S, Nishiyama T, Yoshida M, Fukunaga K. Porcine Hemoglobin Promotes Lipid Excretion to Feces more Strongly than Globin Protein in Rats. Food Sci. Biotechnol. 査読有. 25(S): 107-112, 2016
3. Fukunaga K, Hosomi R, Fukao M, Miyauchi K, Kanda S, Nishiyama T, Yoshida M. Hypolipidemic Effects of Phospholipids (PL) Containing n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Are Not Dependent on Esterification of n-3 PUFA to PL. 査読有. Lipids, 51 : 279-289 January 2016
4. Ooka H, Kanda S, Okazaki H, Suzuki H, Mishima K, Saito I, Yagi M, Tomoda K, Nishiyama T, Characterization of side population (SP) cells in murine cochlear nucleus. Acta Otolaryngol. 査読有. 132(7):693-701, 2012.7.
5. Osumi Y, Shibata SB, Kanda S, Yagi M, Ooka H, Shimano T, Asako M, Kawamoto K, Kuriyama H, Inoue T, Nishiyama T, Yamashita T, Tomoda K, Characterization of side population (SP) cells in murine cochlear nucleus. Brain Res. 査読有. 1454:23-32, 2012.5

<図書>主要な図書 5 冊以内

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. 岡崎はるか、神田靖士、下埜敬紀、王 澤蘊、西山利正、友田幸一、マウス下丘由来神経幹/前駆細胞の性格付けと分化誘導の検討、第13回日本再生医療学会、京都、2014. 3
2. 岡崎はるか、神田靖士、下埜敬紀、王 澤蘊、西山利正、友田幸一、マウス下丘からの神経幹細胞の分離と発現遺伝子の解析、第31回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、大阪、2013. 8
3. Fukunaga K, Hosomi R, Arai H, Kanda S, Nishiyama T, Yoshida M Hemoglobin Reduce Serum and Liver Cholesterol Contents and Increase Fecal Fatty Acids, Cholesterol, and Bile Acids in Rats. 104th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, p. 1, Canada 2013.4
4. Okazaki H, Kanda S, Suzuki H, Ooka H, Nishiyama T, Tomoda T. Characterization of adult mouse tissue specific stem/progenitor cells in inferior colliculus. 10th Annual Meeting International Society Stem Cell Research (ISSCR) 横浜 2012.06
5. 大隅泰則、神田靖士、大岡久司、岡崎はるか、西山利正、友田幸一、下丘における加齢にともなう GluN1 遺伝子の発現制御、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012.12

<特許申請・取得状況>

研究成果報告書の概要

講座等名	外科学	事業推進者	権 雅憲
分担研究課題	疾患モデル動物の開発と解析：難治性ヒト疾患の病態解明と診断・治療への応用		
キーワード	ラット膵臓腫瘍モデル、ゲムシタビン、アンギオテンシン		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	4名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>権 雅憲：研究統括</p> <p>豊川 秀吉：ラット正所性膵臓腫瘍モデルの作成</p> <p>山尾 順：ラット正所性膵臓腫瘍モデルの作成、膵線維化活性抑制と抗腫瘍効果の検討</p> <p>金 成泰：ラット正所性膵臓腫瘍モデルにおける各種薬剤の抗腫瘍効果の検討</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>下記の研究は全て平成 26 年度内に終了している。</p> <p>1) ラット正所性膵臓腫瘍モデルにおけるゲムシタビン（GEM）療法後の α-SMA 陽性筋線維芽細胞様細胞活性の検討</p> <p>DSL-6A/C1 細胞を用いて正所性膵癌ラットを作製し、GEM 化学療法（100mg/kg/週、3 週間）を行った。In vitro にて GEM と共培養すると DSL-6A/C1 細胞増殖は有意に抑制された。膵癌ラットの生存期間（59.6 ± 13.4 日）は GEM 治療群では有意に生存期間が改善した。GEM 治療群の膵癌組織中の α-SMA の発現は有意に減少したが、シリウス赤染色実験では有意差は認めなかった。GEM 治療にて VEGF の発現は有意に減少したが、TGF-β1 発現は阻害されなかった。</p> <p>これらの結果は、GEM は腫瘍増殖を抑制するばかりでなく、VEGF 発現を減少させる事で膵星細胞の抑制を強いていると考えられた。</p> <p>2) ラット膵癌におけるアンギオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗剤；ロサルタン（LOS）の抗腫瘍効果</p> <p>ラットの膵腺癌細胞株である DSL-6A/C1 細胞を用いて膵癌モデルを作成した。作成したラットモデルをコントロール群と GEM 群、LOS 群、GEM + LOS 併用群の 4 群に分けて実験を行った</p> <p>GEM 群と LOS 群、GEM + Los 併用群はでコントロール群に比較して有意に生存期間が延長した。MTT assay では、GEM 単剤または LOS 単剤投与で DSL-6A/C1 細胞株の増殖が容量依存性に抑制された。GEM および LOS 投与群では、コントロール群と比較して、膵癌組織での VEGF 発現が有意に抑制された。以上の結果から GEM と LOS の併用は、アンギオテンシン I を介した VEGF 合成を阻害し細胞増殖を抑制する事によって、ラット膵癌の生存期間を有意に改善したと考えられた。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>下記の研究成果は全て平成 26 年度内に終了している。</p> <p>1) ラット正所性膵臓腫瘍モデルを用いる事により、化学療法に加えて膵星細胞活性を抑制する治療法が確立される事で膵癌治療に対してより効果的な戦略がもたら</p>			

せる可能性を示せた。

2) ラット膵癌モデルを用いた検討で GEM とアンギオテンシン I 拮抗剤の併用により進行膵癌患者の治療成績を改善する可能性が示唆された。

問題点

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

Yamao J, Toyokawa H, Kim S, Yamaki S, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Matsui Y, Kwon AH. Activation of alpha-smooth muscle actin-positive myofibroblast-like cells after chemotherapy with gemcitabine in a rat orthotopic pancreatic cancer model. J Hepatobiliary Pancreat Sci. • レフェリー有 • 20(2) • 2013 • 206-213

Kim S, Toyokawa H, Yamao J, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Hirooka S, Yamaki S, Inoue K, Matsui Y, Kwon AH. Antitumor Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker Losartan for Orthotopic Rat Pancreatic Adenocarcinoma. Pancreas • レフェリー有 • 43(6) • 2014 • 886-890

<図書>主要な図書 5 冊以内

<学会発表>主要な発表 5 件以内

<特許申請・取得状況>

研究成果報告書の概要

講座等名	形成外科学	事業推進者	楠本 健司
分担研究課題	難治性ヒト疾患モデル動物を用いた組織欠損に対する修復、再生、再建の実験的研究		
キーワード	再生医療、創傷治癒、幹細胞、多血小板血漿、電場冷蔵庫、骨形成タンパク		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	11名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・楠本健司：分担研究代表、研究の案出・指導・統括 ・森本尚樹、日原正勝、覚道奈津子、畔熱行、三宅良平：実験の遂行、実験結果の解析など ・小関梨奈、西村京子、藤原奈都美：実験準備など ・院生：来方えん、光井俊人、Sharon：動物実験、標本作製、結果解析など 			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>1：軟部組織再建モデル： ラット背部に創傷治癒ならびに再建のための実験モデルとして規格化した実験的皮弁を作成して延長効果を判定した。皮弁の下への薬剤投与にて差異を検討した。多血小板血漿（PRP：platelet-rich plasma）による効果の有効性が得られ、血管増生や皮弁延長効果の結果が得られている。＜学会発表(1)＞</p> <p>2：難治性皮膚潰瘍治癒モデル： ラット背部に規格化したモデル創傷を作成し、これに対して開放創、ゼラチン、PRP、ゼラチン+PRPでの比較検討を行い、創傷に治癒、組織、血管増生の検討を行った。ゼラチン+PRP適応で、有意に皮膚潰瘍の治癒傾向を認め、組織学的、血管増生、肉芽増生など有意な所見を得た。＜雑誌論文(4)＞</p> <p>3：骨再生モデル： 若齢ラットと老齢ラットにての腓腹筋内への一定の空隙を作成して、異所性骨再生モデルを設定し、骨形成タンパク（rhBMP：recombinant human Bone Morphogenetic Protein）の埋入でいかなる差異を生じるかの検討を行った。有意に若齢ラットの誘導骨が得られ、この骨質、骨髄などを精査して老齢ラットでの誘導骨との比較を行った。＜雑誌論文(3),(8)＞</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>軟部組織、皮膚潰瘍、骨についての再生、再建の一定のモデル動物を作成して、規格化した状態で、パイロットスタディの後、比較検討実験を行い有意な結果を得ることが出来た。</p>			
<p>問題点</p>			

次にヒト臨床に想定される条件を備えた動物モデルの作成に進み、更なる前臨床としての価値ある研究に発展させることが必要と考えている。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

28 年度

(1)Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Hihara M, Notodihardjo PV, Matsui M, Tabata Y, Kusumoto K, Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected into murine subcutis. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. レフェリー有 Epub ahead of print.2016

27 年度

(2)Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Taketani S, Kusumoto K, Hypoxia enhances proliferation of human adipose-derived stem cells via HIF-1 α activation. PLoS ONE, レフェリー有 10(10):Article No. e0139890.2015

(3)Hara T, Kakudo N, Morimoto N, Horio O, Ogura T, Kusumoto K: Effect of aging on the osteoinductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rats. J Surg Res レフェリー有 195(1):377-383,2015.

(4)Notodihardjo PV, Morimoto N, Kakudo N, Matsui M, Sakamoto M, Liem PH, Suzuki K, Tabata Y, Kusumoto K : Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model J Artif Organs レフェリー有 18(1):64-71,2015.

26 年度

(5)Kakudo N, Morimoto N, Kushida S, Ogawa T, Kusumoto K: Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo. Medical molecular morphology レフェリー有 47(2):83-89.2014

25 年度

(6)Kakudo N, Tanaka Y, Morimoto N, Ogawa T, Kushida S, Hara T, Kusumoto K: Adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting: optimal cell concentration and effects on grafted fat characteristics. Journal of translational medicine レフェリー有 11(1): Article No.254.2013

24 年度

(7)Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Ogura T, Notodihardjo PV, Hara T, Kusumoto K: Effects of transforming growth factor-beta1 on cell motility, collagen gel contraction, myofibroblastic differentiation, and extracellular matrix expression of human adipose-derived stem cell. Human cell レフェリー有 25(4): 87-95.2012

(8)Notodiharjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K : Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats.

J Cranio-Maxillofac Surg レフリー有 40(3):287-291,2012.

<図書> 主要な図書 5 冊以内

28 年度 なし

27 年度 なし

26 年度 なし

25 年度 なし

24 年度

Kakudo N, Kushida S, Ogura T, Suzuki K, Kusumoto K : Nova Science Publishers Tissue Engineering: Fundamentals, Techniques and Applications 2012. 5・89-96.

<学会発表> 主要な発表 5 件以内

28 年度

(1) 日原正勝, 覚道奈津子, 森本尚樹, 原 朋也, 来方えん, 楠本健司

ヒト線維芽細胞成長因子 (bFGF) とゼラチンハイドロゲルシートを用いた皮弁生着延長効果の検討

第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会 2016/09 大阪市

27 年度

(2) 覚道奈津子, 森本尚樹, 日原正勝, 小倉常敬, 原 朋也, 鈴木健司, 楠本健司

皮膚潰瘍に対する Magellan Autologous Platelet Separator System を用いた治療の経験

第 58 回日本形成外科学会総会・学術集会 2015/04 京都市

26 年度

(3) Kenji Kusumoto, Naoki Morimoto, Satoshi Fukuda, Natsuko Kakudo, Yoshikazu Miyake, Valentin Priscilla, Tsunetaka Ogura, Tomoya Hara: Principles of PRP and the PRP therapy The 12th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery Incheon, Korea 2014/05

25 年度

(4) 楠本健司, 福田 智, 三宅ヨシカズ, 覚道奈津子, 榎田哲史, Notodihardjo Priscilla Valentin, 小倉常敬, 鈴木健司

多血小板血漿 (PRP) 療法による創傷治療

第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会 2013/11 新潟市

24 年度

(5) 原 朋也, 鈴木健司, 森本尚樹, 覚道奈津子, 榎田哲史, Notodihardjo Priscilla Valentin, 小倉常敬, 楠本健司

若齢ラットと老齢ラットにおける腓腹筋内異所性骨誘導能の検討

第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会 2012/10 福島県猪苗代町

<特許申請・取得状況>

特許出願

発明等の名称: 生体組織又は細胞の保存方法

出願番号: 特願 2014-164746

出願日: 平成 26 年 8 月 13 日

発明者: 楠本健司, 畔 熱行, 森本尚樹, 覚道奈津子, 原 朋也, 大野三規

研究成果報告書の概要

講座等名	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学	事業推進者	友田 幸一
分担研究課題	難治性気道炎症性疾患における好酸球の機能的役割の検討		
キーワード	好酸球、アレルギー性鼻炎、慢性副鼻腔炎、喘息		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>岩井 大（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授）：研究責任者</p> <p>神田 晃（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 講師）：研究代表者（実験計画の立案とまとめ）</p> <p>小林 良樹（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 助教）：実験施行者</p> <p>尹 泰貴（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 大学院生）：実験施行者</p> <p>Bui Van Dan（耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 大学院生）：実験施行者</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>【目的】</p> <p>近年、気道と下気道の炎症性疾患の関連性に対して”one airway, one disease”という概念が提唱されている。その代表的な疾患である喘息を合併する難治性好酸球性気道炎症では、上気道の炎症を治療すると下気道の症状も改善することが知られており、実地臨床において大きな関心事項となっている。しかし、科学的根拠が乏しく、そのメカニズムに関してほとんど解明されていないため、EBM に基づいた新たな治療戦略の確立が急務となっている。そのメカニズムの一つとして上・下気道間に神経学的な interaction、nasal-bronchial reflex（NBR）を介した経路が存在していると推察されているが、十分に解明されていない。上気道炎と下気道炎の NBR を介した interaction を証明する事ができれば、”one airway, one disease”の礎となる新しい理論であり、今後の上・下気道炎症に対する新しい治療戦略の構築に大きく貢献する研究になると期待される。そこで本研究では、以下の 2 点に関して検討をおこなった。</p> <p>① NBR の解明：</p> <p>好酸球性気道炎症においてどのように上気道と下気道が interaction しているかを解明するためには、上気道抵抗(鼻腔抵抗) と下気道抵抗を同時に測定することができるシステムを構築する必要がある。そこで、まず上・下気道抵抗同時測定システム作りに取り組んだ。システムを構築後、気道炎症疾患マウスモデルを用いて上気道刺激がどのように下気道に影響しているか、逆に下気道刺激がどのように上気道に影響しているか検討した。</p> <p>② NBR が気道炎症与える影響：</p> <p>神経学的な相互作用があれば、それが実際に気道炎症増悪に作用するかどうか検討する必要がある。そこで、”one airway, one disease”において最も重要な役割を果たす好酸球と NBR による neural inflammation に注目し検討をおこなった。</p> <p>好酸球の炎症局所での役割を検討するためには、好酸球の動態を追跡することが出来る遺伝子マウスを用いた検討が必要となる。しかし、好酸球を蛍光タンパク質などで発光させ追跡する事が出来るような遺伝子改変マウスは存在していないため、新しい遺伝子改変マウスの作製に着手した。</p>			

【優れた成果があがった点】

① NBR の解明：

通常の方法では、気管内挿管後に ventilation をおこないながら methacholine (MCH) で刺激をして、下気道抵抗 (R_L) を測定して解析するが、本研究ではカニューレを上気道方向にも留置して上気道と下気道を同時に測定できる装置を開発した (特許公開番号 2016-180703)。この装置を用いることで上気道を刺激して下気道の気道抵抗を測定したり (図 a)、下気道を刺激して上気道抵抗を測定することが可能となる (図 b)。その結果、

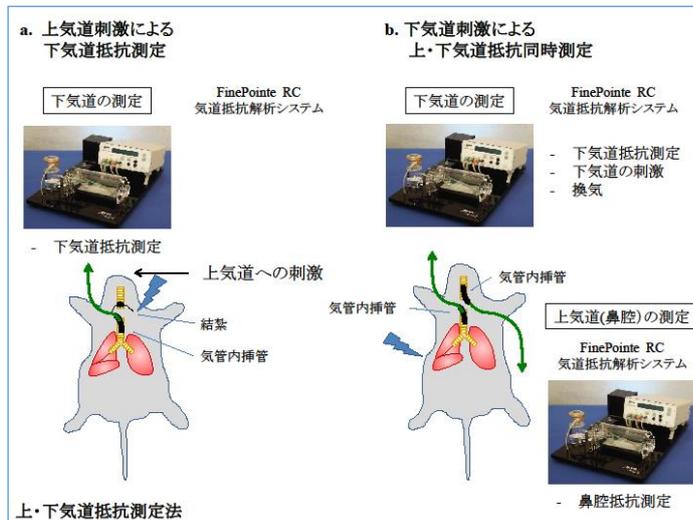
上気道を刺激すると下気道の気道抵抗が上昇した。逆に、下気道を刺激すると上気道の気道抵抗の上昇が認められた。このことから、上気道と下気道間に神経学的な interaction の存在を示唆する結果が得られた。事実、この作用は、硫酸アトロピンの前処理にてほぼ完全にブロックされた。神経経路としては、迷走神経の関与が推察されたため、迷走神経を切断したところ、同様の効果が観察されたことから、コリン作動性の神経学的経路が重要な役割を果たしていることが明になった。つまり、上・下気道間の神経学的な相互作用をはじめて証明することが出来た。

また、この相互作用は、アレルギー性気道炎症マウスモデルにおいて、正常マウスより強い反応が認められたことから、NBR がアレルギー性気道炎症の増悪に関与する事が推察された (unpublished data)。

② NBR が気道炎症与える影響：

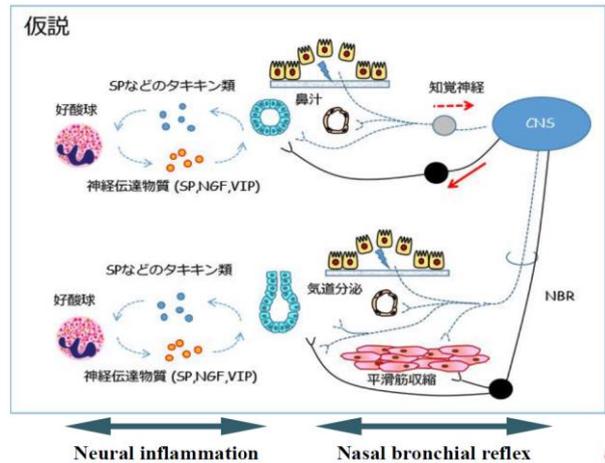
上気道と下気道間においてコリン作動性神経 (迷走神経) が重要な役割を果たしている場合、コリンを介した neural inflammation が関与する事が推察される。事実、脾神経が炎症を制御することが報告されている (Science. 2011;7; 334(6052): 98-101. doi:10.1126)。そこで、好酸球にもニコチン受容体が発現しているどうか検討したところ、マウスやヒトにも $\alpha 4$ nAChR と $\alpha 7$ nAChR が発現していることを明らかにした (unpublished data)。

一方、好酸球をターゲットにした新規遺伝子改変マウスの作製に関しては、好酸球由来の特異的顆粒の一つである EDN (eosinophil-derived neurotoxin) に注目し、EDN の exon2 に Cre タンパク質融合型レポータータンパク質をノックインしたマウス (EDN/CreEGFP マウス) の開発に着手し、F2 のマウス作製まで進んでいる。



【問題点と今後の展開】

本研究において、上気道と下気道間に神経学的な interaction、つまり NBR の存在を示唆する結果が得られたが、実際に炎症の遷延化に関与しているかは不明である。今回、コリン作動性の刺激を行って良好な結果が得られたが、より生理的な刺激として知覚神経の刺激による検討が必要である。現時点では、ヒスタミンやサブスタンス P などの知覚神経刺激剤を用いた予備実験では明確な R_{Na} と R_L の変化は認められなかった。今後は、さまざまな条件下で検討をおこなう必要があると考えている。



上・下気道炎症マウスモデルにおいて、コリン作動性の NBR が実際に炎症に関与することを証明する必要がある(右図の仮説)。そこで、好酸球に発現するニコチン受容体の役割を解析する必要がある。現在我々は、 $\alpha 4$ nAChR は活性化を促進し、 $\alpha 7$ nAChR は活性化を抑制すると推察しており、そのメカニズムを解明する予定である。そのメカニズムの解明が進めば、抗コリン剤による新しい治療戦略につながる事が期待される。

一方、EDN/CreEGFP マウスの開発に関しては、開発に向けた最終段階に至っている。そのマウスを用いることで、好酸球は緑色に発色するので好酸球を追跡する事が可能となる。例えば、2光子顕微鏡を用いれば生きたマウスにおける好酸球のダイナミックな動きを追跡する事ができる。さらに、ノックインしたホモのマウスを用いれば、EDN の機能的役割と NBR の関連性も検討する事が出来る。また、Cre もノックインされているため Rosa26 loxp/stop/loxp/DTA マウスと交配すれば、好酸球欠損マウスを作製する事も可能となる。交配したマウスにおける NBR の役割を検討すれば、より詳細なメカニズムの解明につながる事が期待される。そこで、これら検討を今後おこなっていく予定である。

<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年)
代表論文5編以内

該当なし

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 主要な図書5冊以内

該当なし

<学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は匡名と都市名)・発表年月)
主要な発表5件以内

1. 神田晃、Dan van Bui、河野由美子、宇都宮 啓太、坂田 喜子、松本洋平、小林良樹、岩井大、友田幸一. 新規遺伝子改変マウスと気道過敏性評価法を用いたアレルギー性疾患に対する創薬への挑戦. 新学術説明会 東京 2016.12
2. Kanda A, Kobayashi Y, Asako M, Iwai H. New therapeutic strategy for eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) with asthma, focusing on the new concept of “one airway, one disease”. International symposium on recent advances of rhinosinusitis and nasal polyposis 2016(ISRNP 2016). Malaysia (Kuala Lumpur) 2016.11
3. 神田晃、小林良樹、友田幸一. マウス上・下気道抵抗同時測定装置を用いた新薬の評価法. 新学術説明会 東京 2015.11
4. Kanda A, Kobayashi Y, Asako M, Tomoda K. Our approach to establish “airway medicine”. 16th World Congress of Rhinology. Brazil(Sao Paulo) 2015.05
5. 神田晃、小林良樹、朝子幹也、友田幸一. Nasal-bronchial reflexによる上気道と下気道の interaction と当教室における気道外来の取り組み. 第66回日本気管食道学会 高知 2014.11

<特許申請・取得状況>

1. 名称: 鼻腔抵抗の測定方法、鼻腔抵抗及び肺気道抵抗の測定方法、該方法の実施に用いる測定装置; 特許公開番号 2016-180703; 発明代表者 神田晃
2. 名称: マウス細胞; 特願 2016-198365; 発明代表者 神田晃

研究成果報告書の概要

講座等名	眼科学講座	事業推進者	高橋寛二
分担研究課題			
キーワード	加齢黄斑変性、糖尿病網膜症、緑内障		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			7名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>高橋寛二 プロジェクトリーダー（研究全体を統括）</p> <p>山田晴彦 プロジェクトサブリーダー（研究に従事しながら研究の方向性、成果のまとめ）</p> <p>城 信雄 研究員</p> <p>三木克朗 研究員</p> <p>吉川匡宣 研究員</p> <p>盛 秀嗣 大学院生</p> <p>中川和紀 大学院生</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>当教室には伝統的な疾患モデル動物がある。教室の臨床テーマである加齢黄斑変性に対してはレーザー誘発脈絡膜新生血管の発生モデル、緑内障については水圧を利用した虚血-再灌流モデル、糖尿病網膜症に対しては、低酸素網膜症モデルがある。平成 25 年に滝井地区から枚方地区に研究室が移転した事で、これらの動物モデルを作成する環境が変化した。レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルでは、新しいレーザーを調達する必要があり、低酸素網膜症では新しい動物センターの発足に従い、低酸素網膜症の作成を動物センター内で行なう必要が出た。これらの研究環境の変化によって、今まで問題なく行なっていたモデル動物の作成が困難となり、その環境整備にほぼ 1 年間を費やすことになった。その後、動物センターとの交渉や、新しい機器の導入を行ない、以前と同様に既存のモデル動物に確実な再現性をもって作成する事が可能となった。一方、教室の新しい研究方向として、レーザー誘発脈絡膜新生血管発生モデルに代表される網膜下に発育する脈絡膜新生血管モデルではなく、網膜色素上皮下に発育する脈絡膜新生血管モデルを作成することになった。これについて、大学院生を中心にプロジェクトチームを再構成して、研究を開始したが、モデル動物の作成は困難であった。平成 28 年度に入り、新しい眼科診断機器である光干渉断層計アンジオグラフィ（OCT angiography:OCTA）画像と病理組織の相関をみるための研究を開始した。この研究にはマウスのレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを用い、実際に造影剤なしで脈絡膜新生血管の血管・血流像を撮像することに成功し、国内、国際学会で報告した。</p> <p>一方、教室員の三木克朗は、科学研究費の財源を得て、脈絡膜新生血管治療の新しいアプローチとして、マイクロスフェアを用いた新生血管抑制の研究を行った。結果として基礎研究段階に終わったが、一定の新しい治療に向かう道筋ができたと思われる。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>教室の伝統的な動物モデルが高い再現性をもって再び利用できることになった。</p> <p>科学研究費を得る事ができた。</p> <p>動物飼育に関する様々な装備を眼科研究室において整備し、本格的な実験研究が出来る環境が整った。</p> <p>レーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを OCTA を用いて撮像することに成功した。</p>			
<p>問題点</p>			

眼科学教室として基礎研究に携わる人員に余裕がなく、また研究者自身も臨床や、臨床研究にマンパワーを取られる結果、実験研究の進捗が予定よりも遅れがちになる。動物の麻酔や、飼育に様々な申請や認可が必要で、それらの環境を整える事に多大な時間と労力が必要であった。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Shmueli RB1, Ohnaka M, Miki A, Pandey NB, Lima e Silva R, Koskimaki JE, Kim J, Popel AS, Campochiaro PA, Green JJ: Long-term suppression of ocular neovascularization by intraocular injection of biodegradable polymeric particles containing a serpin-derived peptide. *Biomaterials* レフェリー有り : 2013年 34(30):7544-51
2. Ohnaka M, Miki K, Gong YY, Stevens R, Iwase T, Hackett SF, Campochiaro PA: Long-term expression of glial cell line-derived neurotrophic factor slows, but does not stop retinal degeneration in a model of retinitis pigmentosa. *J Neurochem* レフェリー有:2012 122(5):1047-53

<図書>主要な図書 5 冊以内

1. 高橋寛二: 加齢黄斑変性. 今日の治療指針 2013 年度版. 医学書院. 2013 年 2064 ページ
2. 高橋寛二: 加齢黄斑変性. 今日の治療指針2017年度版. 医学書院, 2017年 1449-1450 ページ

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. 大中誠之、三木明子、Formica R, Shmueli RB, Pandey NB, Hackett SF, Green JJ, 高橋寛二, Popel AS, Campochiaro PA, 血管新生阻害ペプチドナノ粒子被包化マイクロ粒子の網膜下/脈絡膜新生血管抑制効果: 第 117 回日本眼科学会総会 (東京、平成 25 年 4 月 4 日から 7 日)
2. Mori H, Yamada H, Takahashi K, Akama T, Nakamura T: Changes in immunostaining of five elastic fiber Component in Bruch's membrane and laser-induced choroidal neovascularization. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016 Annual meeting, Seattle, USA, 2016/5/1~5
3. Nakagawa K, Yamada H, Takahashi K: Imaging of laser-induced choroidal neovascularization in mice using optical coherence tomography angiography. Association for Research in Vision and Ophthalmology 2017 Annual meetin, Baltimore, USA, 2017/5/1~5

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講座等名	整形外科	事業推進者	飯田寛和
分担研究課題	骨髄内骨髄移植を用いた SKG/jcl マウスの骨粗鬆症治療方法		
キーワード	骨粗鬆症、骨髄移植、SKG/jcl マウス		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			4名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>串田剛俊（准教授）：研究指導 中村知樹（大学院生）：主な研究実施 岡本尚史（助教）：研究補助 おおえ賢一（助教）：研究補助</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～26 年度の研究成果について）</p> <p>目的：関節リウマチなどの自己免疫疾患は疾患活動性のため、通常より骨粗鬆症が進行する。炎症の原因となる未分化骨髄細胞（造血系細胞ならびに間葉系細胞）を正常骨髄細胞と置換することにより、骨粗鬆症の自然経過を正常に戻すことが可能か、また、骨粗鬆症の誘因因子について研究した。</p> <p>研究方法：今回の研究に用いた SKG/jcl は関節炎自然発症モデルである。発症要因は多因子であり、関節リウマチのモデルマウスと考えられている。このマウスに 5Gx2 回の放射線分割照射を行った後、マウス脛骨に正常マウスである C57/BL6 マウスの骨髄を直接移植した。</p> <p>結果：ドナーである C57/B6 マウスの全骨髄細胞を骨髄移植することにより、SKG/jcl マウスの骨髄（造血系細胞）には置換されていた。さらに、骨内にある骨芽様細胞（間葉系細胞）もドナー由来に置換されていた。臨床的には SKG/jcl マウスの関節炎は消失し、尿中 DPD は正常マウスと同様の自然経過となっていた。また、C57/B6 マウスの lineage negative 骨髄細胞（未分化骨髄細胞）を、SKG/jcl マウスに移植しても同様の結果であった。</p> <p>考察：成熟した T 細胞や B 細胞などを除く、未分化な骨髄細胞自体が関節炎や骨粗鬆症を引き起こす原因と考えられた。難治性自己免疫疾患の治療として、白血球除去療法（LCAP）があるが、根治的治療法として骨髄細胞移植が有用であると思われた。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>難治性自己免疫疾患の治療方法は確立していない。 自己免疫疾患自体は未分化骨髄細胞自体に原因があるため、骨髄移植が有用な治療方法の 1 つと考えられた。</p>			

問題点

今回の実験はモデルマウスであるため、臨床的に応用するには骨髄移植の生着率、GVHDなどの安全性を高める必要がある。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Nakamura T, Kushida T, et al: Induction of autoimmune arthritis after direct injection of bone marrow cells from arthritis-prone SKG/Jcl mice into bone cavity of normal mice: *Bulletins of the Pharmaceutical Society*. 2014. In press
2. 中村 智寿, 串田 剛俊, 他 : マウスモデルによる骨髄内骨髄移植を用いた関節リウマチ発症原因の検討 *関西医科大学雑誌* 63 巻 2012.199-200

<図書>主要な図書 5 冊以内

なし

<学会発表>主要な発表 5 件以内

中村 知寿、串田 剛俊、他 : 関節リウマチモデル SKG/Jcl マウスにおける骨髄移植を用いた関節炎発症原因の検討. *日本整形外科学会* 2013 年

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	救急医学講座	事業推進者	中谷壽男
分担研究課題	脊髄損傷に対する動物モデルの作成と細胞治療の開発に向けて		
キーワード	脊髄損傷、脊髄再生、骨髄間質細胞、骨髄単核球、髄液内投与		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	1名		
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>本研究は脊髄損傷に対して、脊髄神経細胞の壊死の進展の防止と脊髄再生を図るべく、臨床においては自己骨髄細胞の髄液内投与による治療の臨床試験を本研究が他機関において共同研究として遂行しており、それを補完する動物実験も他機関において本研究が共同実験を進めているものである。</p> <p>本学においては、滝井病院の施設の整備状況から、ヒトに対する細胞治療を行うに求められる手術室の整備要件を満たして居らず、現段階では他機関において共同研究に参加するという体裁を撮って来たが、滝井病院が改築された際には設備要件を満たすことが出来ると考えられるために、将来には多施設共同の臨床試験に参加出来るように準備を進めている所である。</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～26 年度の研究成果について）</p> <p>私どもは、関西医科大学附属滝井病院、先端医療センター、北野病院、藍野大学と共同で、これまでは関西医科大学附属滝井病院救命救急センターが主導する形で、急性期の脊髄損傷症例に対して患者の骨髄間質細胞を髄液内に投与し、脊髄機能の再生を図る臨床試験 Phase I、II を実施してきて安全性の確認を行ってきた。しかし、受傷後 72 時間以内の急性期における細胞採取という時間的制約のために、対象症例数が限定される状況にあった。そこで、受傷後の亜急性期、慢性期に同様の処置を行った場合に効果が期待出来ないか、を調べるために、動物実験にて脊髄損傷モデルを作成し、1-4 週後の亜急性期、慢性期に骨髄間質細胞の髄液内投与にて神経機能の再生が得られないかを調べた。動物実験にて同種の GFP-transgenic rat の骨髄間質細胞を培養し、損傷ラットの第 4 脳室内に毎週 1 回計 3 回髄注した。運動機能（BBB score）は対照群と比較して有意な差を認めた。組織学的にも Schwann cell を伴った多数の axon が遠位方向にも近位方向にも伸びていることが確認出来た。また、移植した間質細胞はすべて 7 日後には消滅していた。これらより、受傷後亜急性期、慢性期においても髄液内に投与した骨髄間質細胞は neurotrophic source として作用した後、消滅することにより、安全に再生効果が期待出来るものと考えられた。</p> <p>この実験を受けて、ヒトの亜急性期、慢性期の脊髄損傷に対する治療の臨床試験を北野病院において、共同研究で行った。急性期では無いために、臨床試験に参加を申し込む患者は予想より多く、その後、短期間で 10 症例に対する臨床試験を予定より早く終了した。有害事象は認めず、2 名で著明な運動機能の改善、5 名で若干の改善をみた。3 例は無効であった。</p> <p>これらの臨床試験を通して安全性には問題が無いことから、現在は次のステップとして多施設共同研究に向けた厚生労働省や倫理委員会への申請の準備作業を共同研究者が行っている。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>動物モデルを通じて、亜急性期、慢性期においても本治療法の効果が期待出来る可能性があること、安全性に問題が無いことが判った。受傷後 72 時間以内の急性期治療では、患者や家族が脊髄損傷の知識、予後への認識が無く、臨床試験に参加する症例の収集に難</p>			

渋したが、亜急性期・慢性期を治療の対象と出来る事が判れば、適用できる患者が非常に多くなり、治療方法として確立できれば、多くの脊髄損傷患者に治療法の選択が広がることと成り、朗報であると考える。

問題点

骨髄細胞採取、細胞分離の後に、髄液内投与を行うために、現滝井病院の手術室はその施設基準を満たさないために、新滝井病院の開院まで、滝井病院としては臨床試験に参加出来ない。

枚方病院で実施するにはスタッフ移動をはじめとする種々の問題がある。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1) Norihiko Nakano, Yoshiyasu Nakai, Tae-Beom Seo, Tamami Homma, Yoshihiro Yamada, Masayoshi Ohta, Yoshihisa Suzuki, Toshio Nakatani, Masanori Fukushima, Miki Hayashibe, Chizuka Ide : Effects of Bone Marrow Stromal Cell Transplantation through CSF on the Subacute and Chronic Spinal Cord Injury in Rats. PLoS ONE レフェリー有 8(9):2013年 e73494. doi:10.1371

2) Yoshihisa Suzuki, Hirai, Namiko Ishikawa, Katsunori Ohnishi, Hidetaka Nishida, Katsutoshi Tamura, Norihiko Nakano, Toshio Nakatani, Masanori Fukushima, and Chizuka Ide: Bone marrow-derived mononuclear cell transplantation in spinal cord injury patients by lumbar puncture. Restorative neurology and neuroscience レフェリー有、32 : 473-482, 2014

<図書>主要な図書 5 冊以内

なし

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1) Toshio Nakatani, Yoshihisa Suzuki, Fukuki Saito, Masaaki Iwase, Yuji Maeda, Masanobu Tsuda, Yasuyuki Kuwagata, Masanori Fukushima, Chizuka Ide : CLINICAL TRIALS FOR SPINAL INJURY TREATMENT WITH AUTOLOGOUS BONE MARROW CELLS ADMINISTERED INTO CEREBROSPINAL FLUID. 7th Asian Conference on Emergency Medicine, Tokyo, 2013年10月

2) 齊藤福樹、津田雅庸、中谷壽男、鎌方安行、岩瀬正顕、鈴木義久、井出千束、福島雅典：脊髄損傷に対する新しい治療法。骨髄由来単核球を用いて。久留米、2013年9月

3) Toshio NAKATANI, Fukuki SAITO, Yoshihisa SUZUKI, Masanori FUKUSHIMA, Chizuka IDE : Intrathecal administration of bone marrow mononuclear cells for the treatment of spinal injury: A clinical trial. International Surgical Week 2013, Helsinki, Finland, 2013年8月

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講座等名	神経内科学講座	事業推進者	日下 博文
分担研究課題	難治性神経筋疾患の病態解明と臨床研究		
キーワード	筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、タウオパチー		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			7名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>日下博文：研究代表者として課題を総括的に指導する</p> <p>金子鋭：分担研究者として結果の解析や論文執筆を行う</p> <p>和手麗香：分担研究者として結果の解析や論文執筆を行う</p> <p>中村正孝：分担研究者として研究課題全般に取り組む</p> <p>藤田賢吾：分担研究者として研究課題全般に取り組む</p> <p>柘植彩子：大学院生として個別の研究課題に取り組む</p> <p>隠岐光彬：大学院生として個別の研究課題に取り組む</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>1. 筋萎縮性側索硬化症の病態に関する研究</p> <p>我々は筋萎縮性側索硬化症(ALS)において神経細胞の生存・保護に関与する TGF β /Smad シグナル伝達が障害されていることをこれまでに報告してきた。本研究では、細胞モデルを用いて TGF β /Smad シグナルと TDP-43 凝集体形成との関連について検討した。核移行シグナル(NLS)を変異させた TDP-43 発現プラスミド(ΔNLS-TDP-43)を HEK293T 細胞に発現させると、本来核に存在する TDP-43 はプロテアソーム阻害下で細胞質内に凝集体を形成した。この細胞モデルにおいて、TGF β /Smad シグナルの賦活により細胞死を引き起こすことなく TDP-43 凝集体形成が抑制されたことから、ALS における治療法の開発において TGF-β /Smad シグナルが重要なターゲットとなる可能性が示唆された。</p> <p>Optineurin (OPTN) E478G 変異を有する家族性 ALS の神経病理学的検討を行った。TDP-43 陽性封入体は ubiquitin や p62 に陽性であったが OPTN には陰性であった。TDP-43 陽性封入体を持つ脊髄前角細胞では核の TDP-43 染色性が低下していた。Golgi 装置の断片化は 70%の前角細胞に観察された。核の TDP-43 染色性が保たれているのに Golgi 装置が断片化している神経細胞も多く見られたことから、核の TDP-43 染色性低下に先行して Golgi 装置の障害が生じる可能性が示唆された。</p> <p>また、I113T SOD1 変異を有する家族性 ALS の神経病理学的検討を行い、他の変異を有する家族性 ALS 症例の報告と比較し、病態について考察した。</p> <p>2. 好塩基性封入体形成と FUS 蛋白の核細胞質間移送の異常に関する研究</p> <p>FUS 変異を有する ALS や BIBD の好塩基性封入体(basophilic inclusion, BI)において、OPTN, FUS および myosin IV が共存することを見いだした。一方 TDP-43 や SOD1 は BI と共存していなかった。これまでの結果とあわせて OPTN は TDP-43, SOD1 および FUS という 3 つの ALS の関連タンパク質すべてと相互作用することが明らかになった。FUS は NF-κB の co-activator であり、OPTN は NF-κB の活性化を抑制することが知られている。FUS や OPTN が BI に補足されることにより NF-κB の制御障害を来し、神経細胞変性に至る可能性がある。また OPTN と myosin IV は Golgi 装置の安定化に関わっており、これらの障害により Golgi 装置の断片化が生じて神経細胞死を来す可能性がある。</p>			

また FUS 変異を有する ALS において、核細胞質間輸送を担う transportin 1 が FET タンパクと特異的に凝集しており、その他の transportin cargo には結合していないことを見出した。このことから FUS 変異を有する ALS においては、transportin と FET タンパクとの相互作用に異常があり、核細胞質間輸送が障害されている可能性が示唆された。

3. パーキンソン病モデルラットにおけるレボドパ投与方法の違いによるレボドパ誘発ジスキネジア (LID) の発症と線条体での遺伝子発現の変化についての研究

ラットの一側内側前脳束に 6-OHDA を局所投与し、一側パーキンソン病モデルラットを作製した。これを三群に分け、①無治療、②レボドパ持続投与（浸透圧ポンプ）、③レボドパ間欠投与（一日二回腹腔内注射）の処置を 2 週間行った後、レボドパ誘発性ジスキネジア (LID) の発症と、線条体におけるドパミン D1、D2 受容体、アデノシン A2A 受容体の mRNA の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR で測定し術側と健側で比較した。LID は②では発症せず③では発症した。ドパミン受容体発現量は①では変化は無かったが、②では D2 受容体のみ術側で増加し、③では D1、D2 受容体共に術側で増加した。A2A 受容体は③のみ術側で増加していた。LID はレボドパ間欠投与で発症し、D1 および A2A 受容体の増加が関連している。この変化を抑制することが LID の発症予防につながる可能性がある。

5. タウオパチーにおける BRCA1 の異常蓄積に関する研究

二本鎖 DNA 損傷に対し、DNA 修復と細胞周期制御に関わる breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) が、アルツハイマー病 (AD) の神経原性変化内に異常蓄積していることが報告された。我々は Pick 病、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症の剖検脳において BRCA1 の局在を免疫組織化学的に検討した。その結果、タウオパチー共通の病態として、BRCA1 の異常が関与している可能性が示唆された。

優れた成果があがった点

神経変性疾患の封入体を神経病理学的に検討することにより、TDP-43 の核からの偏在、Golgi 装置の断片化、NF-κB の制御障害、TGFβ₂/Smad シグナル伝達系の異常等が神経細胞死に関与していることが明らかになった。

PD の早期診断における単回レボドパ投与の臨床検査法を施行し、前向きに経過観察して得た臨床診断をもとに感度・特異度を検討し日本人患者におけるカットオフポイントを提案した。さらに近年注目されている ¹²³I-MIBG 心筋シンチグラフィの感度・特異度と直接比較し、その有用性を確認した。PD の早期診断の一助となる検査の提案により、多くの PD 患者で診断率の向上が期待できる。

モデル動物を作成し、レボドパ投与方法の違いによる LID 発症と線条体でのドパミン D1 受容体およびアデノシン A2A 受容体の遺伝子発現量の変化の関係を明らかにした。

問題点

TDP-43 と神経細胞死との直接の関わりについては未だ明らかでないことから、分子イメージングの手法を用いてさらなる検討を進める。

PD 患者における LID 発症予防法につなげるためには、ドパミン D1 受容体やアデノシン A2A 受容体の遺伝子発現量が増加する仕組みを明らかにする必要がある、今後の検討課題である。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

1. Oki M, Kaneko S, Morise S, Takenouchi N, Hashizume H, Tsuge A, Nakamura M, Wate R, Kusaka H, Zonisamide ameliorates levodopa-induced dyskinesia and reduces expression of striatal genes in Parkinson model rats, *Neurosci Res* あり (2017, in press)
2. Nakamura S, Wate R, Kaneko S, Ito H, Oki M, Tsuge A, Nagashima M, Asayama S, Fujita K, Nakamura M, Maruyama H, Kawakami H, Kusaka H. An autopsy case of sporadic amyotrophic lateral sclerosis associated with the I113T SOD1 mutation. *Neuropathology* あり 34(1):58-63 2014
3. Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Jiang S, Fujita K, Wate R, Nakano S, Fujisawa JI, Kusaka H. Activation of Transforming Growth Factor- β /Smad Signaling Reduces Aggregate Formation of Mislocalized TAR DNA-Binding Protein-43. *Neuro-degenerative Diseases* あり 11(4):182-193 2013
4. Nakamura M, Kaneko S, Wate R, Asayama S, Nakamura Y, Fujita K, Ito H, Kusaka H. Regionally different immunoreactivity for Smurf2 and pSmad2/3 in TDP-43-positive inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology* あり 39(2):144-156 2013
5. Neumann M, Valori CF, Ansorge O, Kretschmar HA, Munoz DG, Kusaka H, Yokota O, Ishihara K, Ang LC, Bilbao JM, Mackenzie IR. Transportin 1 accumulates specifically with FET proteins but no other transportin cargos in FTLD-FUS and is absent in FUS inclusions in ALS with FUS mutations. *Acta neuropathologica* あり 124(5):705-716 2012

<図書>主要な図書 5 冊以内

エキスパートに学ぶパーキンソン病・パーキンソニズム Q&A

高橋良輔監修 大江田知子、金子鋭、齋木英資、澤本伸克、高橋牧郎、山門穂高
南山堂 (2017)、248 ページ

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. Oki M, Kaneko S, Morise S, Nakamura M, Wate R, Takenouchi N, Kusaka H. Expression of mRNA for adenosine A2A receptor in rat model of levodopa-induced dyskinesia. 第 57 回日本神経学会学術大会, 神戸、2016/5
2. 中村正孝、金子鋭, 朝山真哉, 三宅浩介, 藤田賢吾, 國枝武伸, Dennis Dickson, 日下博文 タウオパチーにおける DNA 損傷修復蛋白 BRCA1 の異常蓄積 第 55 回日本神経学会学術大会 福岡 2014/5
3. 中村正孝, 金子鋭, 藤田賢吾, 和手麗香, 中野智, 藤澤順一, 伊東秀文, 日下博文 TGF- β /Smad シグナルによる TDP-43 凝集抑制効果の検討 第 54 回日本神経学会学術大会 東京 2013/5
4. 日下博文 運動ニューロン病の分子病態 日本内科学会関東支部主催 第 47 回生涯教育講演会 東京 2012/12
5. Nakamura M, Kaneko S, Ito H, Fujisawa J, Kusaka H. Activation of Transforming Growth Factor- β /Smad Signaling Reduces Aggregate Formation of Mislocalized TAR DNA binding protein-43 64th AAN Annual Meeting, New Orleans, USA 2012/4

<特許申請・取得状況> なし

研究成果報告書の概要

講座等名	皮膚科	事業推進者	岡本 祐之
分担研究課題	紫外線皮膚障害修復機構における表皮メラノサイト		
キーワード	紫外線、メラノサイト、メラニン、ユーメラニン、フェオメラニン、アポトーシス		
講座内の本プロジェクト参加研究者数			3名
<p>研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等）</p> <p>山崎文和：実験計画立案・修正、論文作成、動物維持 Hong Chuuyen：動物維持、動物への紫外線照射、組織切片作成、染色 大学院生 三宅知織：動物維持、動物への紫外線照射、メラニンの染色 大学院生</p>			
<p>研究成果の概要（平成 24～28 年度の研究成果について）</p> <p>メラニンには紫外線防御能力の大きいユーメラニンと紫外線感受性の高いフェオメラニンの2種類が存在している。ヒトでは表皮にメラノサイトが存在するが、マウスのメラノサイトは真皮に存在するので、ヒトの皮膚組織の研究においてマウスを実験動物として用いることには制限がある。ヒトのようにメラノサイトを表皮に有するマウスは既に存在しているが、かかるマウスにおけるメラノサイト発現量は過剰なものであり、異常な色素沈着が見られるので実験動物としては不適切なものであった(J Invest Dermatol, 125, 521, 2005)。そこでバッククロスを何度も行うことにより表皮内ユーメラニンの含有量が少なく、フェオメラニンの含有量の多い新しい SCF-Tg マウスを作製した。このマウスはフェオメラニン含有量が多く、ユーメラニン含有量が少ないため通常の SCF-Tg マウスより格段に紫外線感受性が高く、ヒトの皮膚により近いと考えられる(特許番号 第 4406696 号)。このマウスを用いて、紫外線照射実験を行った結果、ヒトの皮膚に近い状態では、照射初期ではユーメラニンが増加した細胞では、アポトーシスが効率良く誘導され紫外線障害を受けた細胞を排除していたことが解った。また、長期照射によりユーメラニンが多量に表皮内の存在する状態になると、紫外線そのものが表皮内に到達しにくくなり皮膚障害が発生しにくい状態となることがわかった。</p> <p>また、このマウスを用いることにより、外用する成分の紫外線発癌機能や Sunscreen 剤としての能力を検討することができた。</p>			
<p>優れた成果があがった点</p> <p>現在までのモデル動物とは異なり、生理学的にヒトに近い環境で紫外線照射の検討を行うことができ、メラニン存在量により表皮内での細胞障害の程度と除去機構が異なることが判明した事は優れた成果が挙げられた点と考える。</p>			

問題点

問題点としては、最終検討目的である表皮メラノサイトそのもののユーメラニン、フェオメラニン存在下でのダメージは有意差が判明せず、今後も検討の必要があると思われた。

<雑誌論文>代表論文 5 編以内

<図書>主要な図書 5 冊以内

<学会発表>主要な発表 5 件以内

1. Chiori Miyake, Fumikazu Yamazaki, Wakako Inoue, Kana Mizuno, Hiroyuki Okamoto, Curcumin analoge GO-Y030 inhibits UV induced inflammation and carcinogenesis. International Investigative Drrmatology 2013, Edinburgh, The United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland. 10, May, 2013.

<特許申請・取得状況>

特願 2008-309930

「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」
(平成24年度～平成28年度)

疾患モデル動物の開発と解析：
難治性ヒト疾患の病態解明と診断・治療への応用
研究成果報告書

関西医科大学

平成 29 年 5 月
