関西医科大学 附属生命医学研究所紀要

第17号

2022 年度

2023 年度

関西医科大学附属生命医学研究所

附属生命医学研究所は、2006年に旧肝臓研究所を改組し、新たな研究の礎として設立されました。当初は分子遺伝学部門、生体情報部門、モデル動物部門の3部門でスタートし、次いで、神経機能部門や侵襲反応制御部門が設置されました。平成30年度にはゲノム編集部門とゲノム解析部門が加わり、更に令和3年度にはがん生物学部門を新設し、現在では8部門体制で運営されています。

研究所は、免疫、神経、代謝、発生、ゲノム、がんの各分野において、基礎研究から 臨床研究まで幅広く活動しており、本学全体の研究力の向上と発展に寄与する重要な 役割を担っています。また、綜合研究施設、実験動物飼育共同施設、アイソトープ実 験施設との連携により、最先端の研究環境を整備し、学内外の研究者が柔軟に利用で きる体制を構築しています。

本紀要では、2022 年度から 2023 年度における当研究所の研究成果をまとめております。これが、内外の研究者の皆様にとって、研究の参考となり、新たな発見や共同研究のきっかけとなることを心より願っております。

附属生命医学研究所 所長 日笠幸一郎

研究組織 (2024年3月31日時点)

〔研究部門〕

05	子遺伝学部門…		4
	教授	木梨 達雄	$(2005.4\sim)$
	学長特命教授	清末 優子	$(2023.6\sim)$
	准教授	植田 祥啓	(2008.9~)
	講師	上岡 裕治	$(2016.4\sim)$
	講師	近藤 直幸	$(2012.9\sim)$
	助教	池田 幸樹	$(2018.10\sim2023.4)$
O <u>*</u>	上体情報部門		11
	准教授	松田 達志	$(2007.7\sim)$
	助教	住吉 麻美	$(2016.4\sim)$
04	モデル動物部門…		14
	准教授	李 成一	$(2007.4\sim)$
	講師	村山 正承	$(2019.5\sim)$
○ネ	申経機能部門		19
	研究所教授	小早川 令子	$(2015.4\sim)$
	講師	松尾 朋彦	$(2024.1\sim)$

○侵襲反応制御部門23						
	研究所教授	小早川 高	$(2016.4\sim)$			
	学長特命教授	廣田 喜一	$(2016.6\sim2022.6)$			
	講師	松尾 禎之	$(2016.9 \sim)$			
○ゲノム解析部門····································						
	研究所教授	日笠 幸一郎	$(2018.4\sim)$			
	講師	安河内 彦輝	$(2021.8\sim)$			
○ゲノム編集部門·······37						
	学長特命准教授	徳弘 圭造	$(2018.4\sim)$			
	助教	福田 尚代	$(2018.7 \sim 2023.3)$			
○がん 生物学 部門······40						
	学長特命教授	坂本 毅治	$(2021.7\sim)$			
	助教	田中 伯享	$(2022.1 \sim 2024.3)$			
〔共同利用研究部門〕						
○綜合研究施設48						
○実験動物飼育共同施設······52						
○アイソトープ実験施設						

○分子遺伝学部門

令和 4 (2022) 年度

<研究概要>

T細胞の極性形成における Rap1/Talin の役割の検討

リンパ球の極性形成(前後形成)は組織内、組織間移動における運動性や方向性に重要な 役割を果たす。 低分子量 G タンパク Rap1 はリンパ球のインテグリンを活性化して接着を誘 導する分子であるが、極性形成における役割は明らかでない。我々は Rap1 欠損 T 細胞を単 離してケモカインで刺激し、極性形成をイメージストリームと人工知能により定量した。正 常型に比べ、Rap1 欠損T細胞においては、極性形成の効率が低下し、一方、Rap1 の不活性 化を誘導する RapGAP のノックアウトでは自発的に極性形成をすることがわかった。よっ て Rap1 はケモカインによる T 細胞の極性形成過程に重要な役割を果たしていると考えられ る。細胞の後端の伸長には低分子量 G タンパク RhoA によるミオシンの活性化とそれによ る張力が必要である。Rap1 欠損 T 細胞では RhoA の活性化とミオシン軽鎖のリン酸化・後 方局在が低下した。 逆に RapGAP のノックアウトでは自発的に RhoA の活性化・ミオシン軽 鎖のリン酸化が亢進した。よって RhoA の制御とミオシンの活性化の破綻が Rap1 欠損T細 胞の極性形成異常に関与すると考えられる。また、Talin1 は Rap1 の下流でインテグリンに 結合し活性化する因子である。我々は欠損マウスを用いて Talin1 がインテグリンの非依存 的に T 細胞の極性形成を促進することを見出した。Talin1 欠損マウスでは極性形成が阻害 されるが RhoA の活性化を変えずにミオシンのリン酸化に必要であることが明らかとなっ た。

T細胞特異的 Rap1 シグナル遺伝子欠損マウスを用いたリンパ球接着シグナルの解析

低分子量 G タンパク Rap1 とその下流因子 Kindlin-3、Talin-1 の各遺伝子を欠損させたマウスを用いて、リンパ節へのホーミングおよび in vitro での接着を解析した。Rap1 と Talin1 はホーミングに必須であるのに対して、Kindlin-3 の欠損効果は 50%程度であった。Kindlin-3 欠損 T 細胞は細い内径の高内皮細静脈(HEV)への接着が阻害されていたが、比較的内径が大きい HEV に接着しており、高濃度の ICAM1 に結合できることから、Kindlin-3 は高親和性 LFA1 の生成に必要であることが示唆された。より詳細に血管内皮との接着過程に測定するために血流環境下での接着評価系を樹立し、血流のある生体環境を再現したところ、LFA1 とそのリガンド ICAM1 の組み合わせでは「outside-in シグナル」と「inside-out シグナル」が同時に起こることで Rap1 が活性し、Talin1 がリクルートされローリングから停止接着を誘導し、停止する段階で Kindlin-3 がさらに必要であることがわかった。Rap1 の不活性化因子である、RASA3、SIPA1 それぞれの KO マウスおよび RASA3、SIPA1 のダブル KO T 細胞においては、静置条件下ケモカイン刺激なしでは接着分子リガンドに結合できるほどに Rap1 が活性化していた。一方で興味深いことに、流動環境下では ICAM1 と LFA1、

MAdCAM1 と integrin α4β7 の組み合わせに違いがあることを見出した。これらのデータをまとめ、論文リバイス中である。

リンパ球の細胞接着における LFA1 細胞内動態可視化系の確立

白血球特異的インテグリンである LFA1 は αL 鎖と β2 鎖からなるヘテロ二量体膜タンパ ク質であり、免疫応答の起点となる細胞間接着に重要な役割を担う。LFA1 は細胞内から細 胞外のシグナル (inside-out シグナル)と、LFA1 のリガンド ICAM1 の結合に伴う細胞外から のシグナル(outside-in シグナル)の二種類の双方向性シグナルによって活性化が制御されて いる。以前の近藤らの研究から LFA1 は outside-in シグナル依存的に細胞接着面に強く蓄積 することを解明していたが、この過程の制御メカニズムは不明であった。リンパ球内での LFA1 の動態を可視化する目的で、光安定性の高い蛍光物質を生きた細胞内で目的のタンパ ク質に標識することが出来る SNAP-tag を LFA1 の β 鎖の C 端側 (細胞内側) に融合させた リンパ球を作製した。可視化には、高速に撮像可能なスピニングディスク型共焦点顕微鏡で あり、Super-Resolution Radial Fluctuation (SRRF)-Stream モジュールを使用することで空間分 解能が約 70nm 程度までの超解像イメージングも可能な Dragonfly を使用した。β2-SNAP を 発現するリンパ球を SNAP-Cell 647- SiR で標識し、接着したリンパ球における LFA1 の局在 を調べたところ、LFA1 は細胞接着面では先行研究と一致して一様に蓄積したが、接着面よ り上部の場所ではLFA1は細胞内でクラスター状に局在した。また、このクラスターは未刺 激のリンパ球では形成されておらず、outside-in シグナル依存的に形成された。さらに、ラ イブイメージングにより動態を観察したところ、LFA1 クラスターは細胞内を頻繁に動き回 っていることが明らかになった。今後このクラスターに局在する因子群を種々の抗体を用 いた免疫染色に探索し、LFA1 動態制御機構の解明を目指す。

<List of Publication>

① 論文・総説等

(原著)

 Thuy H, Ueda H, Tran L, <u>Kondo N</u>, Tsukaguchi H. High-Resolution Imaging of Inter-Organelle Interaction and Vesicle Trafficking in Live-Cells Expressing the INF2 Variants. *Journal of The American Society of Nephrology*. 2022;33:413-.

(総説)

- 1. <u>Kondo N, Ueda Y, Kinashi T</u>. LFA1 Activation: Insights from a Single-Molecule Approach, *Cells*. 2022 May 26;11(11):1751. DOI: 10.3390/cells11111751.
- ②主要な学会発表 (発表者名、テーマ名、学会名、発表年 都市名)
- 1. Kinashi T. "Recent progress of integrin research and integrin-targeted therapeutics for immune

- diseases." The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology ,2022 Dec.8 (C04-01), Kumamoto. (招待講演)
- 2. <u>Kondo N, Kamioka Y, Ikeda Y, Ueda Y, Kinashi T</u>. "Distinct binding properties of integrin adaptors talin1 and kindlin-3 to LFA1 and α4 integrins modulate adhesive responses in static and shear-flow conditions." The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology ,2022 Dec.9(WS22-09-O/P), Kumamoto. (口頭・ポスター)
- 3. <u>Ueda Y</u>, Higasa K, <u>Kamioka Y</u>, <u>Kondo N</u>, Horitani S, <u>Ikeda Y</u>, Fukuhara T, Fukui Y, <u>Kinashi T</u>. "Rap1 facilitates cell polarization via RhoA signaling in T cells." The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2022 Dec.9(WS17-09-O/P), Kumamoto. (口頭・ポスター)
- 4. <u>Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Ikeda Y, Kinashi T</u>. "Subsecond Rap1 activation by outside-in signaling of LFA1/ICAM1 interactions strengthens L-selectin mediated rolling of T cells." The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2022 Dec.9(WS22-17-P), Kumamoto. (ポスター)
- 5. Horitani S, <u>Ueda Y</u>, <u>Kamioka Y</u>, <u>Kondo N</u>, <u>Ikeda Y</u>, Fukuhara T, Naganuma M. and <u>Kinashi T</u>. "The critical role of Rap1GAPs in T cell recirculation and egress from lymph node." The 51st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2022 Dec.7(WS01-18-P), Kumamoto. (ポスター)
- 6. <u>Ikeda Y</u>, Takeda H, <u>Kinashi T</u>. "A Design of integrin-miniature for novel therapeutics against virus infections." The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan), 2022 Dec. 1 (2P-674), Chiba (ポスター)

令和5(2023)年度

<研究概要>

高精度時空間計測による細胞情報解析

従来のイメージング技術では得ることができなかった三次元的な細胞活動情報を取得するため、国内唯一となる、ボリューム (3D) ライブイメージングが可能な「格子光シート顕微鏡」の高解像モデルを導入した。当該顕微鏡による多次元画像データを解析するために、空間統計学手法や機械学習を用いた新規な特徴抽出技術を開発し、発生や疾患に関連する分子や細胞機能を解析した。機械学習においては、学習結果をヒトが解釈するインタラクティブなカーネル・ベースの新しい手法を考案してがん遺伝子による細胞内微細構造の変化検出に実践した。その結果、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の新たな機能を見出し、腫瘍細胞が染色体を再編成することで増殖能を獲得していく機構の一端を明らかにした。また、微小管細胞骨格制御によるエネルギー代謝制御や、細胞膜形態制御による細胞外小胞生成機構に関する知見を得た。さらに、細胞分化機構の解析のために、腸管幹細胞から派生する増殖が活性化された TA 細胞(transit amplifying cell)に特異的に発現する遺伝子を同定した。これらの発見に基づき、治療標的になる可能性がある細胞のがん化を許容する機構の解明や、

細胞レベルの生体制御機構の探索を推進している。

T細胞の極性形成における Rap1/Talin の役割の検討

リンパ球の極性形成(前後形成)は組織内、組織間移動における運動性や方向性に重要な 役割を果たす。低分子量 G タンパク Rapl はリンパ球のインテグリン活性化因子で接着を誘 導する分子であるが、極性形成を担うことをイメージストリームと人工知能により明らか にした。正常型に比べ、Rap1 欠損 T 細胞においては、極性形成の効率が低下し、一方、Rap1 の不活性化を誘導する RapGAP のノックアウトでは自発的に極性形成をすることがわかっ た。次に、Rap1 の活性化の機序として、DOCK2 と PI3K 依存的な F-actin 重合が Rap1 の活 性化に重要であることを明らかにした。さらに、Rap1 が極性を誘導する機序について検討 した。細胞の後端の伸長には低分子 G タンパク量 RhoA によるミオシンの活性化とそれに よる張力が必要であるが、Rap1 欠損 T 細胞では RhoA の活性化およびミオシンの軽鎖のリ ン酸化・後方への局在が低下しており、逆に RapGAP のノックアウトでは自発的な RhoA の 活性化・ミオシン軽鎖のリン酸化が亢進していた。 よって RhoA の制御およびミオシンの活 性化・局在の破綻が Rapl の欠損 T細胞の極性形成異常に関与すると考えられる。これらと 相関して、Rap1 欠損 T 細胞では RhoGEF である GEF-H1 の後方への局在が低下していた。 また、Rap1の下流のインテグリン活性化因子 Talin1 はインテグリンの非依存的に極性形成 を促進することを、Talin1 欠損 T細胞の解析により明らかにした。この欠損 T細胞では RhoA の活性化を変えずにミオシン軽鎖のリン酸化が低下していた。加えて、Rap1 結合ドメイン を欠損する Talin1 を発現する細胞株を用いて、Talin1 による極性制御には Rap1 との相互作 用が必要であることも明らかにした。 以上により、Rap1-Talin1 軸による RhoA―ミオシン経 路の活性化制御を介してT細胞の極性形成を促進することが明らかとなり、この内容で国 際学術誌に発表した。

T細胞特異的 Rap1 シグナル遺伝子欠損マウスを用いたリンパ球接着シグナルの解析

細胞接着制御因子 Rap1 とその下流分子 Kindlin-3、Talin-1 はリンパ球動態を制御する。これまでの解析結果から、Rap1 と Talin1 はホーミングに必須であるのに対して、Kindlin-3 の欠損効果は 50%程度であった。Kindlin-3 欠損 T 細胞は細い内径の高内皮細静脈(HEV)への接着が阻害されていたが、比較的内径が大きい HEV に接着し高濃度の ICAM1 に結合できることから、Kindlin-3 は高親和性 LFA1 の形成に必要であることが示唆された。血管内皮との接着過程を正確に測定するために血流環境下での接着評価系を樹立し解析を行った。 LFA1 とそのリガンド ICAM1 の組み合わせでは「outside-in シグナル」と「inside-out シグナル」が同時に起こることで接着制御因子 Rap1 が活性し、インテグリン結合分子 Talin1 がリクルートされローリングから停止接着を誘導し、停止する段階で Kindlin-3 がさらに必要であることがわかった。インテグリン $\alpha4\beta7$ とリガンド MAdCAM1 での組み合わせでは、ローリングには Rap1 や Talin1、Kindlin-3 は必要なく、「outside-in シグナル」から「inside-out シ

グナル」が連続して起こることが停止接着に重要であることが分かり、これらのデータをま とめ論文発表した。

リンパ球の細胞接着における新規制御因子 Rab8 の発見

自血球特異的インテグリン LFA1 は免疫細胞間の細胞接着依存的に接着面に蓄積し接着能の制御に重要な役割を果たすが、その制御機構は不明であった。前年度までに超解像顕微鏡を用いた LFA1 の細胞内可視化系を確立し、LFA1 は細胞内では動的なクラスターを形成することを解明していた。LFA1 クラスターに局在する因子について抗体を用いた免疫染色により探索したところ、LFA1 クラスターは小胞輸送に関わる低分子量 G タンパク質 Rab8と共局在することが分かった。Rab8a/Rab8bを欠損させたリンパ球(Rab8-DKO)を作製し細胞接着能と LFA1 の接着面への蓄積を調べたところ、Rab8-DKO ではどちらも野生型に比べて低下した。また、Rab8 の活性化を検出するプローブを用いた解析から Rab8 は細胞接着面で活性化され、この活性は Rab8 を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子 Rabin8 によって制御されていた。近藤らがこれまでに独自に確立したリンパ球上での LFA1 とリガンドICAM1 の結合の一分子計測実験から、Rab8 は LFA1-ICAM1 結合における結合頻度に影響を与え、結合時間には影響しないことが分かった。以上から、Rab8 は Rabin8 による細胞接着面での活性化依存的に LFA1 の接着面への蓄積を促進し、LFA1 と ICAM1 の結合頻度を制御する新規の LFA1 制御因子であることが示唆された。

<List of Publication>

①論文・総説等

(原著)

- Nguyen LM, Kanda A, <u>Kamioka Y</u>, Tokuhiro K, Kobayashi Y, Yun Y, Bui DV, Chu HH, Le NKT., Suzuki K, Mitani A, Shimamura A, Fukui K, Dombrowicz D, Iwai H. Mouse eosinophilassociated ribonuclease-2 exacerbates the allergic response. *Allergy*. 23 February 2024 DOI: 10.1111/all.16061, 2024/02
- 2. Kobayashi S, <u>Kondo N</u>, Tomiyama T, Nakamura N, Masuda M, Matsumoto Y., Honzawa Y, Tahara T, Ikeura T, Fukui T, Okazaki K, Naganuma M. Intravenous injection of tumor extracellular vesicles suppresses tumor growth by reducing the regulatory T cell phenotype, *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 72(11):3651-3664, 2023/11
- Takeuchi K, Senda M, <u>Ikeda Y</u>, Okuwaki K, Fukuzawa K, Nakagawa S, Sasaki M, Sasaki AT, Senda T. Functional molecular evolution of a GTP sensing kinase: PI5P4Kβ, *The FEBS journal*, 290(18):4419-4428, 2023/09
- <u>Ueda Y</u>, Higasa K, <u>Kamioka Y</u>, <u>Kondo N</u>, Horitani S, Ikeda Y, Bergmeier W, Fukui, Y, <u>Kinashi T</u>. Rap1 organizes lymphocyte front-back polarity via RhoA signaling and talin1. *iScience*, 2023 Jul 11;26(8):107292. eCollection 2023 Aug 18., DOI: 10.1016/j.isci.2023.107292, 2023/07

- 5. Horitani S, <u>Ueda Y, Kamioka Y, Kondo N, Ikeda Y</u>, Naganuma M, <u>Kinashi T</u>. The critical role of Rap1-GAPs Rasa3 and Sipa1 in T cells for pulmonary transit and egress from the lymph nodes, *Frontiers in immunology*, 14:1234747, 2023/07
- 6. Fukuhara T, <u>Ueda Y</u>, Lee SI, Odaka T, Nakajima S, Fujisawa JI, Okuma K, Naganuma M, Okazaki K, <u>Kondo N</u>, <u>Kamioka Y</u>, Matsumoto M, <u>Kinashi T</u>. Thymocyte Development of Humanized Mice Is Promoted by Interactions with Human-Derived Antigen Presenting Cells upon Immunization, *International journal of molecular sciences*, 24(14):11705, 2023/07
- 7. Ueda H, Tran QTH, Tran LNT, Higasa K, <u>Ikeda Y</u>, <u>Kondo N</u>, Hashiyada M, Sato C, Sato Y, Ashida A, Nishio S, Iwata Y, Iida H, Matsuoka D, Hidaka Y, Fukui K, Itami S, Kawashita N, Sugimoto K, Nozu K, Hattori M, Tsukaguchi H. Characterization of cytoskeletal and structural effects of INF2 variants causing glomerulopathy and neuropathy, *Scientific reports*, 13(1):12003, 2023/07
- Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Tokuhiro K, Ikeda Y, Bergmeier W, Kinashi T. Distinct bidirectional regulation of LFA1 and α4β7 by Rap1 and integrin adaptors in T cells under shear flow, *Cell reports*, 42(6):112580, 2023/06
- Ravid Y, Penič S, <u>Mimori-Kiyosue Y</u>, Suetsugu S, Iglič A, Gov NS, Theoretical model of membrane protrusions driven by curved active proteins, *Frontiers in molecular Biosciences*, 10:1153420, 2023/05

(総説)

- 1. <u>清末 優子</u> "非回折超薄ライトシートによる高精度多次元細胞イメージング" Optronics: 光技術コーディネートジャーナル 42 (8), 113-117, オプトロニクス社, 2023.
- 2. 清末 優子 "孤独な細胞から社会的な細胞への回帰" 光学,52(7),135,2023.
- ② 主要な学会発表 (発表者名、テーマ名、学会名、発表年 都市名)
- 1. <u>Ueda Y</u>, Higasa K, <u>Kamioka Y</u>, <u>Kondo N</u>, Horitani S, <u>Ikeda Y</u>, Bergmeier W, Fukui Y, <u>Kinashi T</u>. "Rap1-Talin1 axis facilitates front-back cell polarity independent of talin1 binding to integrins in lymphocyes." The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2024 Jan.17-19(WS10-07-P), Chiba. (ポスター)
- 2. Horitani S, <u>Ueda Y</u>, <u>Kamioka Y</u>, <u>Kondo N</u>, and <u>Kinashi T</u>. "Rap1-GAPs Rasa3 and Sipa1 are required for pulmonary transit and egress from the lymph nodes in T cells." The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2024 Jan.17-19(WS10-08-O/P), Chiba. (ロ頭・ポスター)
- 3. <u>Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T.</u> "Distinct bidirectional regulation of integrins by Rap1, talin1 and kindlin-3 in T cells under shear flow." The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology ,2024 Jan.17-19(WS27-02-P), Chiba. (ポスター)

- 4. <u>清末 優子</u> 「Lattice light-sheet 顕微鏡法の原理とアプリケーション」分子細胞生物学会 ワークショップ:生命科学研究におけるライトシート顕微鏡利活用の最先端(神戸), 2023 年 12 月. (招待講演)
- 5. <u>近藤直幸,清末優子</u>,木梨達雄 「オートファゴソーム含有因子 LC3 によるリンパ球細胞接着面へのインテグリン LFA1 輸送の制御」日本生化学会大会、2023 年 10 月 31 日 —11 月 1 日 (1P-302)、福岡 (ポスター)
- 6. トランチュイフォンクィン、 <u>近藤直幸</u>、塚口裕康 "Cytoskeleton-Organelle Interaction in Cells Expressing INF2 Variants that Cause Glomerulopathy and Peripheral Neuropathy." 日本 生化学会大会, 2023 年 10 月 31 日—11 月 1 日 福岡
- 7. Kawasaki Y, Hayashi A, Sakai S, Tokushige N, Sasagawa S, Nakagawa H, <u>Mimori-Kiyosue Y</u>. "APC mutant cells exploit compensatory chromosome alterations to gain tumor initiation and progression potentiall." 日本組織培養学会第 95 回大会(岡山), 2023 年 9 月. (招待講演)
- 8. Kawasaki Y, Hayashi A, Sakai S, Tokushige N, Sasagawa S, Nakagawa H, <u>Mimori-Kiyosue Y</u>. "APC mutant cells exploit compensatory chromosome alterations to gain tumor initiation and progression potential." 第 82 回日本癌学会学術総会(横浜), 2023 年 9 月. (ポスター)

③ 著書

1. <u>清末 優子</u> "格子光シート顕微鏡:高解像型ライトシート顕微鏡"実験医学別冊:ライトシート顕微鏡実践ガイド組織透明化&ライブイメージング,185-192, 羊土社,2023 (分担執筆)

○生体情報部門

令和 4 (2022) 年度

<研究概要>

本部門では、個体レベルの免疫応答のシステムを、個々の免疫担当細胞が持つ細胞内情報 伝達の視点から分子レベルで理解することを目指している。具体的には、自然免疫系と獲得 免疫系の橋渡し的存在である樹状細胞、獲得免疫系の司令塔である T 細胞や獲得免疫系の中でも液性免疫を司る B 細胞、ならびに即時型アレルギー反応のメディエーターとして花 粉症やアトピー性皮膚炎のエフェクター細胞として機能するマスト細胞を対象に、代謝調節に関わる mTORC1 経路ならびに小胞輸送制御に関わる Arf 経路の視点から、これら免疫担 当細胞の機能制御の分子基盤解明を目指すと共に、mTORC1 経路・Arf 経路を標的とした人為的な免疫制御の可能性を追求している。

Arf ファミリーは小胞輸送制御に関わる低分子量 G タンパク質であり、Arf1-Arf6 の 6 つ のファミリー分子から構成される。培養細胞を用いた研究から、細胞のホメオスタシス維持 に重要な役割を果たすと考えられてきた。その一方で、免疫系に代表される高次生体機能に どのように関わっているかについては不明な点が多く残されている。Arf ファミリーの発現 レベルをマスト細胞で調べたところ、Arf1 が最も高い発現を示すことが明らかとなった。 実際、阻害剤や優性不能型変異体の過剰発現系を用いた先行研究から、Arf1 経路がマスト 細胞の脱顆粒過程で重要な役割を担うことが示唆されている。そこで、マスト細胞における Arf1 の機能を検証するため、タモキシフェン誘導性に Arf1 を欠失可能なマウスを樹立し、 その骨髄を用いて in vitro でマスト細胞を分化させたところ、Arf1 欠失によりマスト細胞 分化が著しい障害を受けることが明らかとなった。詳細な解析の結果、Arf1 は IL-3 や SCF など、マスト細胞の増殖・分化に重要なシグナル伝達経路の下流において mTORC1 シグナル の活性化に関与しており、Arf1 欠損による mTORC1 シグナルの低下がマスト細胞の分化障害 の原因であることが明らかとなった。その一方、先行研究とは異なり、Arf1 欠損は高親和 性 IgE 受容体を介したマスト細胞の活性化過程に影響を及ぼさず、野生型マスト細胞と同 様なサイトカイン産生や脱顆粒反応を示した。以上の結果は、従来考えられてきたモデルと は異なり、Arf1 経路がマスト細胞の分化成熟過程に特異的に関与することを強く示唆して いる。今後は、マスト細胞の活性化過程で働く Arf 類縁分子の探索に取り組む予定である。

<List of Publication>

① 論文・総説等

Arf1 facilitates mast cell proliferation via the mTORC1 pathway. <u>Yui Kotani</u>, <u>Mami Sumiyoshi</u>, Megumi Sasada, Toshio Watanabe, and <u>Satoshi Matsuda</u>. *Sci. Rep.* **12**: 22297, 2022.

② 学会発表

Arf pathway plays a critical role in metabolic reprogramming during T cell activation. <u>Mami Sumiyoshi</u>, <u>Yui Kotani</u>, and <u>Satoshi Matsuda</u>. 第51回日本免疫学会学術集会 2022年12月8日

Arf1-BKO マウスでは Germinal Center B 細胞が消失する <u>小谷 唯</u>, <u>住吉 麻実</u>, 笹田 萌未, 小澤 まどか, 片貝 智哉, 渡邊 利雄, <u>松田 達志</u> 第 45 回日本分子生物学会年会 2022 年 12 月 1 日

Arf によるミトコンドリアの機能制御と T 細胞の生存維持 <u>住吉 麻実</u>, 松尾 禎之, <u>小谷 唯</u>, 笹田 萌未, 渡邊 利雄, <u>松田 達志</u> 第 31 回 Kyoto T Cell Conference 2022 年 5 月 28 日

Arf ファミリーは Arf1-Arf6 の6種類のファミリー分子から構成され、アミノ酸の相同配

令和5(2023)年度

<研究概要>

列に基づき、Arf1-Arf3 からなるクラス I、Arf4 と Arf5 からなるクラス II、ならびに Arf6 が属するクラス III に大別される。マウスの脾臓 B 細胞を対象に、Arf ファミリー分子の 発現レベルを調べたところ、クラスIに属する Arf1 ならびにクラス III に属する Arf6 の 発現が高く、それに準じてクラス II 分子である Arf4・Arf5 の発現が認められた。 そこで、 B 細胞特異的に Cre を発現する mb1-Cre マウスと、Arf1-flox マウスならびに Arf6-flox マ ウスを交配して、B細胞特異的 Arf1 欠損マウスならびに B細胞特異的 Arf6 欠損マウス(以 下、Arf1-BKO・Arf6-BKO と表記)を樹立した。得られたマウスの血清中の抗体価を調べた ところ、Arf6-BKOにおいては、IgM・IgAレベルの若干の低下が観察されたものの他のサブ クラスについては概ね野生型と比肩しうるレベルで存在しており、タンパク質抗原である 卵白アルブミン(OVA)をマウス足底部に免疫した際には、 野生型とほぼ同じレベルで抗 OVA 抗体の産生が誘導された。一方、Arf1-BKOでは血清中のIgGサブクラスのレベルが激減し ており、OVA に対する抗体産生能もほぼ完全に消失していることが明らかとなった。 Arf1-BKO マウスの脾臓を調べると、野生型マウスに比べて B 細胞数の低下が認められたも のの、その程度は限定的で OVA 抗原に対する抗体産生能の消失を説明しうるものではなか った。そこで、タンパク質抗原に対する抗体産生過程で中心的な役割を果たす所属リンパ節 における胚中心を詳細に調べたところ、Arf1-BKO マウスにおいて免疫応答に伴う胚中心形 成が著しく障害されていることが明らかとなった。同様の現象は、ダニ抗原を模倣したパパ イン誘導性のアレルギーモデルでも確認され、経鼻投与されたパパインによって縦隔リン パ節に形成されるべき胚中心形成が著しく障害されると共に、パパイン応答性の IgE 産生 がほぼ完全に消失していた。以上の結果は、Arf1-BKO マウスにおける抗体産生能の低下の 背景に、B 細胞の活性化に必須な胚中心応答の障害が存在することが強く示唆するものであ り、Arf1 を標的とすることで、花粉症やアトピー性皮膚炎の要因となる IgE をはじめとし

た病的な抗体の産生を抑制しうるものと期待される。現在、その分子機序の解明に取り組んでいる。

<List of Publication>

論文・総説等

Oncogenic K - Ras^{G12V} cannot overcome proliferation failure caused by loss of Ppp6c in mouse embryonic fibroblasts. Mai Ito, Nobuhiro Tanuma, <u>Yui Kotani</u>, Kokoro Murai, Ayumi Kondo, <u>Mami Sumiyoshi</u>, Hiroshi Shima, <u>Satoshi Matsuda</u>, and Toshio Watanabe. *FEBS Open Bio* **14**: 545-554, 2024.

Mechanism of cystogenesis by Cd79a-driven, conditional mTOR activation in developing mouse nephrons. Linh Tran Nguyen Truc, <u>Satoshi Matsuda</u>, Akiko Takenouchi, Quynh Tran Thuy Huong, <u>Yui Kotani</u>, Tatsuhiko Miyazaki, Hiroaki Kanda, Katsuhiko Yoshizawa, and Hiroyasu Tsukaguchi. Sci. Rep. 13:508, 2023.

② 学会発表

Arf1 regulates germinal center B cell differentiation in draining lymph nodes. Yui Kotani, Mami Sumiyoshi, Madoka Ozawa, Tomoya Katakai, and Satoshi Matsuda. 第52回日本免疫学会学術集会 2024年1月19日

The Arf pathway maintains T cell survival during activation by modulating the level of mTORC1 signal. <u>Mami Sumiyoshi</u>, <u>Yui Kotani</u>, and <u>Satoshi Matsuda</u>. 第52回日本免疫学会学術集会 2024年1月18日

Arf-mTORC1 軸の破綻に伴うアポトーシス亢進機構の解明 <u>住吉 麻実</u>, <u>小谷 唯</u>, 渡邊 利雄, 松田 達志 第 32 回 Kyoto T Cell Conference 2023 年 6 月 18 日

○モデル動物部門

令和 4(2022)年度

<研究概要>

物理的刺激反応型人工プロモーターの開発(李成一)

遺伝子治療は、次世代の医療として注目されているが、課題も少なくない。遺伝子の標的細胞への導入およびベクターの安全性、治療遺伝子の適切性、遺伝子発現の調節などが重要である。遺伝子の導入においては、治療用の遺伝子情報を組み込んだレトロウイルスなどを細胞内に浸入させる手法がとられているが、成功例は少なく、より画期的な DNA 導入法の開発が研究されている。また、治療遺伝子についても多様な遺伝子(細菌毒素など)が研究されている。標的細胞に適切な治療用遺伝子が導入されても、その遺伝子を効率よく場所及び時間での制御調節することで効果が倍増すると考えている。

本研究者たちは、放射線、抗癌剤または超音波の刺激により活性化する複数の転写因子の結合配列をランダムに(繰り返し、変転など)組み合わせた DNA 断片が、その刺激に敏感に反応して下流の遺伝子発現を亢進するプロモーターを構築できることを見いだした。予想可能な配列ではないため、目的の活性が発揮できるかのスクリーニングは必要ではあるが、自然界では存在しないユニークなプロモーターの構築が可能である。さらに、変異導入型 PCR 法(error-prone PCR)により転写因子の結合部位にランダムに変異を入れることにより、反応性が大きく変化されることが in vitro 実験において確認できた(J. Gene Med., 10: 316-324 (2008))。変異導入を繰り返すことにより、さらに反応性の高いプロモーターが構築できる。現在、超音波の刺激による酸化ストレスに対するプロモーター活性についても、活性が増強されることを、様々な腫瘍細胞ににおいて検討を重ねている(Ultrasonics Sonochemistry, 16: 379-386(2009))。人工的な刺激に応答するプロモーターを利用した場合、治療用遺伝子を標的領域に一旦導入すれば、刺激を与えた時のみ、刺激を与えた部位でのみ遺伝子の発現が亢進し、従来のものよりも効率的な癌治療に結びつくことを期待している。

免疫系におけるニコチン性アセチルコリン受容体の役割の解明(村山正承)

喫煙はガンや免疫疾患などの疾患に関与することが知られるが、一方で興味深いことにタバコに含まれるニコチンが内在性受容体であるニコチン性アセチルコリン受容体(nAChRs)を介して免疫系を制御する機能を持つことが近年明らかになりつつある。皮膚の肥厚や紅斑、鱗屑、落屑が特徴的な慢性炎症性皮膚疾患である乾癬において、喫煙が発症に関与する因子であると考えられるが、nAChRs 活性化の影響は知られていない。乾癬の病変組織は皮膚組織だが、皮膚を構成する表皮角化細胞、神経細胞、免疫細胞において nAChRs や内在性リガンドであるアセチルコリンが発現している。そこで乾癬モデルマウスを用いてニコチンの影響を検討した結果、ニコチン投与は乾癬の発症を抑制することを見出した(Murayama MA, Translat Regulat Sci. 2022)。

一方で、ニコチンは乳がん細胞における PD-L1 および PD-L2 の発現を制御することも見出している (Murayama MA, et al., PLoS One. 2022)。これらの研究成果より、ニコチンは負の部分だけでなく、研究試料として、生体内における nAChRs の生理機能の解明に有用であること、また実際に免疫系においては正の生理機能を発揮することが明らかとなった。

<List of Publication>

- 1)論文·総説等
- 1. Murayama MA, Takada E, Takai K, Arimitsu N, Shimizu J, Tomoko S, Suzuki N. Nicotine treatment regulates

- PD-L1 and PD-L2 expression via inhibition of Akt pathway in HER2-type breast cancer cells. *PLoS One*. 2022 Jan 27;17(1):e0260838.
- 2. <u>Murayama MA</u>. Nicotine treatment shows the therapeutic effect for imiquimod-induced psoriasiform dermatitis in alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor-independent manner. *Translat Regulat Sci.* 2022 Apr;4(1):5-11.
- 3. Shimizu J, <u>Murayama MA</u>, Miyabe Y, Suzuki N. Immunopathology of Behcet's disease: an overview of the metagenomic approaches. *Rheumato*. 2022 Sep 2;2(3):74-86. "Feature Paper".
- 4. Iwayama T, Iwashita M, Miyashita K, Sakashita H, Matsumoto S, Tomita K, Bhongsatiern P, Kitayama T, Ikegami K, Shimbo T, Tamai K, <u>Murayama MA</u>, Ogawa S, Iwakura Y, Yamada S, Olson LE, Takedachi M, Murakami S. Plap-1 lineage tracing and single-cell transcriptomics reveal cellular dynamics in the periodontal ligament. *Development*. 2022 Oct 1;149(19):dev201203.

②学会発表

- 1. 大高 時文, <u>李成一</u>, 中嶋 伸介, 上野 孝治, 藤澤 順一, 大隈 和. HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた ATL 発症における腸内細菌叢の関与. 第 75 回日本細菌学会関西支部総会 京都 2022 年 11 月 19 日
- 2. 大隈 和, 手塚 健太, 中嶋 伸介, 後藤 元人, 高橋 利一, <u>李成一</u>, 大高 時文, 伊藤 守, 浜口 功. ヒト化 NOG-A2 マウスを用いた HTLV-1 持続感染モデルの開発. 第8回日本 HTLV-1 学会学術集会 東京 2022 年 11 月 5 日
- 3. Tokifumi Odaka, Makoto Yamagishi, Jun Mizuike, Daisuke Honma, <u>Sung-il Lee</u>, Shinsuke Nakajima, Takaharu Ueno, Kaoru Uchimaru, Kazu Okuma, Jun-ichi Fujisawa. Valemetostat, an EZH1/2 inhibitor, suppresses HTLV-1 infection in a humanized mouse model. 20th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses(HTLV22) (WEB, Melbourne)2022 年 5 月 8 日
- 4. <u>村山正承</u>. 疾患モデルマウスを用いた神経変性・免疫疾患の発症機構の解明および治療薬・治療法開発. 第 69 回日本実験動物学会総会. 宮城県. 2022 年 5 月 18-20 日. **奨励賞受賞招待講演**.
- 5. <u>村山正承</u>, 紀 熙華, 岩倉洋一郎. CTRP3-AdipoR2 は Th17 細胞分化を制御して多発性硬化症モデルを抑制する. 第 69 回日本実験動物学会総会. 宮城県. 2022 年 5 月 18-20 日.
- 6. Chi HH, <u>Murayama MA</u>, Iwakura Y. Elucidation of the mechanism of action of CTRP6 in chronic kidney disease. JSICR/MMCB 2022 Joint Symposium. Tokyo (Japan). Jun 9-10, 2022. Video presentation.
- 7. <u>Murayama MA</u>, Chi HH, Iwakura Y. The CTRP3-AdipoR2 axis regulates the development of multiple sclerosis model mice by suppressing Th17 cell differentiation. JSICR/MMCB 2022 Joint Symposium. Tokyo (Japan). Jun 9-10, 2022.
- 8. Yabe R, Chung SH, <u>Murayama MA</u>, Saijo S, Iwakura Y. TARM1 plays an important role for the development of arthritis. JSICR/MMCB 2022 Joint Symposium. Tokyo (Japan). Jun 9-10, 2022.
- 9. <u>Murayama MA</u>. THE CTRP3-ADIPOR2 AXIS REGULATES THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS BY SUPPRESSING TH17 CELL DIFFERENTIATION. Cytokines 2022 & ILC4 2022. Hawaii (USA), Sep 20-23, 2022. ICIS 2022 Travel Awards.
- 10. <u>Murayama MA</u>. The development of Behcet's disease model mice by antigen peptides. Tri-lab Joint Symposium 2022. "In Vivo Research for Innovation and Biomedical Science Using Genetically Modified Mice". 栃木県, 2022 年 10 月 21-22 日. 招待講演.

11. Shimizu J, <u>Murayama MA</u>, Miyabe Y, Suzuki N. Gut Microbe Metabolite Short-Chain Fatty Acids May Associate with Development of Respiratory Involvement in Patients with Relapsing Polychondritis. ACR Convergence 2022. Philadelphia(USA), Nov 10-14, 2022.

(3)著書

- 1. <u>村山正承</u>, 上野宏樹. Clinical Academic Topics, 神経麻痺性角膜炎における神経炎症の役割. **アレルギー** の**臨床** 2022 年 5 月 号 医療従事者におけるアレルギー. 2022 May 20; 42(5): 371-373.
- 2. <u>村山正承</u>. Clinical Academic Topics, CTRP3-AdipoR2 による Th17 細胞分化の制御による多発性硬化症の抑制. アレルギーの**臨床** 2022 年 6 月 リウマチ・膠原病の最新情報. 2022 Jun 20; 42(6): 465-467.
- 3. 清水潤, <u>村山正承</u>, 鈴木登. Biological Academic Topics, ヒト末梢血 T 細胞分化異常と腸内細菌叢変化の 病理的関連検討. アレルギーの臨床 2022 年 7 月号 アレルゲン免疫療法の最新情報と将来展望. 2022 Jul 20; 42(7): 56-60. 転載.
- 4. 清水潤, <u>村山正承</u>, 鈴木登. ヒト末梢血 T 細胞分化異常と腸内細菌叢変化の病理的関連検討. アレルギー の**臨床** 2022 年 11 月号. アレルギー研究の展望. 2022 Oct 31; 42(11): 44-48. 転載.

令和 5(2023)年度

<研究概要>

物理的刺激反応型人工プロモーターの開発(李成一)

遺伝子治療は、次世代の医療として注目されているが、課題も少なくない。遺伝子の標的細胞への導入およびベクターの安全性、治療遺伝子の適切性、遺伝子発現の調節などが重要である。遺伝子の導入においては、治療用の遺伝子情報を組み込んだレトロウイルスなどを細胞内に浸入させる手法がとられているが、成功例は少なく、より画期的な DNA 導入法の開発が研究されている。また、治療遺伝子についても多様な遺伝子(細菌毒素など)が研究されている。標的細胞に適切な治療用遺伝子が導入されても、その遺伝子を効率よく場所及び時間での制御調節することで効果が倍増すると考えている。

本研究者たちは、放射線、抗癌剤または超音波の刺激により活性化する複数の転写因子の結合配列をランダムに(繰り返し、変転など)組み合わせた DNA 断片が、その刺激に敏感に反応して下流の遺伝子発現を亢進するプロモーターを構築できることを見いだした。予想可能な配列ではないため、目的の活性が発揮できるかのスクリーニングは必要ではあるが、自然界では存在しないユニークなプロモーターの構築が可能である。さらに、変異導入型 PCR 法(error-prone PCR)により転写因子の結合部位にランダムに変異を入れることにより、反応性が大きく変化されることが in vitro 実験において確認できた(J. Gene Med., 10: 316-324 (2008))。変異導入を繰り返すことにより、さらに反応性の高いプロモーターが構築できる。現在、超音波の刺激による酸化ストレスに対するプロモーター活性についても、活性が増強されることを、様々な腫瘍細胞ににおいて検討を重ねている(Ultrasonics Sonochemistry, 16: 379-386(2009))。人工的な刺激に応答するプロモーターを利用した場合、治療用遺伝子を標的領域に一旦導入すれば、刺激を与えた時のみ、刺激を与えた部位でのみ遺伝子の発現が亢進し、従来のものよりも効率的な癌治療に結びつくことを期待している。

疾患モデルマウスを用いた免疫疾患発症機構の解明及びその治療応用(村山正承)

遺伝的因子・環境因子が複雑に関与することで自己免疫疾患が発症する。ベーチェット病をはじめとする難治疾患には、その病態を反映する優れた疾患モデル動物が欠如することから疾患発症機構の解明や治療薬・治療法の開発が遅れている。そこでベーチェット病・再発性多発軟骨炎などを対象とした疾患モデルマウスの開発

を試みた。具体的にはこれら疾患への関与が示唆されている自己抗原を標的として、遺伝的背景・性別を考慮した上で、免疫方法(抗原・免疫賦活剤の種類、投与量・頻度、免疫箇所など)の検討を実施した。その結果、十分な病態形成の構築には至らないものの、免疫学的特性を反映する誘導条件を見出した。今後も継続して疾患モデルマウスの開発を検討していく。

また大阪大学との共同研究より、免疫制御因子 COMMD3/8 が自己免疫疾患の新しい治療標的として有用であることを見出した。本研究成果は各種メディアにて報道されている。

<List of Publication>

① 論文・総説等

- Takataro Fukuhara, Yoshihiro Ueda, Sung-Il Lee, Tokifumi Odaka, Shinsuke Nakajima, Jun-Ichi
 Fujisawa, Kazu Okuma, Makoto Naganuma, Kazuichi Okazaki, Naoyuki Kondo, Yuji Kamioka, Mitsuru
 Matsumoto, Tatsuo Kinashi. Thymocyte Development of Humanized Mice Is Promoted by Interactions with
 Human-Derived Antigen Presenting Cells upon Immunization. *Int. J. Mol. Sci.* 24(14) 11705-11705 (2023)
- Takaaki Koma, Tokifumi Odaka, Sung-il Lee, Naoya Doi, Tomoyuki Kondo, Kazu Okuma, Jun-Ichi Fujisawa, Akio Adachi, Masako Nomaguchi. Humanized mice generated by intra-bone marrow injection of CD133positive hematopoietic stem cells: application to HIV-1 research. Front. Virol. 3., 30 June 2023:1192184
- 3. Shirai T, Nakai A, Ando E, Fujimoto J, Leach S, Arimori T, Higo D, van Eedem FJ, Tulyeu J, Liu YC, Okuzaki D, **Murayama MA**, Miyata H, Nunomura K, Lin B, Tani A, Kumanogoh A, Ikawa M, Wing JB, Standley DM, Takagi J, Suzuki K. Celastrol suppresses humoral immune responses and autoimmunity by targeting the COMMD3/8 complex. *Sci Immunol*. 2023 Mar 31;8(81):eadc9324.
- 4. **Murayama MA**, Shimizu J, Miyabe C, Yudo K, Miyabe Y. Chemokines and chemokine receptors as promising targets in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2023 Jan 13;14:1100869.
- 5. Shimizu J, **Murayama MA**, Mizukami Y, Arimitsu N, Takai K, Miyabe Y. Innate immune responses in Behçet disease and relapsing polychondritis. *Front Med.* 2023 Jun 26:10:1055753.
- 6. **Murayama MA**. The past and present of therapeutic strategy for Alzheimer's disease potential for stem cell therapy. *Exp Anim*. 2023 Aug 7;72(3):285-293. "**Invited Paper**".

②学会発表

- 1. Takeshita A, Kurokawa M, Tachibana D, Koyama M, Morimoto Y, <u>Murayama MA</u>, Iwakura Y, Hashimoto S. Alternative pathway specific complement regulator C1q/TNF-related protein 6 is related the placental development and fetal growth. The 1st Asian Congress for Reproductive immunology (ACRI). Hyogo (Japan), Apr 8-9, 2023. Poster presentation. **Outstanding Awards**.
- 2. <u>村山正承</u>. 乾癬発症における補体 C3a/C3aR の役割の解明. 第 70 回日本実験動物学会総会. 茨城県, 2023 年 5 月 24-26 日.
- 3. <u>村山正承</u>. 表皮角化細胞の表皮恒常性維持機構に着目した、nAChRs による乾癬治療薬・治療法の開発. 令和4年度助成研究発表会. 東京都, 2023 年 7 月 20 日.
- 4. <u>村山正承</u>. 免疫学の基礎から RP 研究の最前線へ~生物学的製剤の開発を目指して~. 再発性多発軟骨炎(RP)患者会シンポジウム 2023. 東京都, 2023 年 11 月 3 日. **招待講演**.

(3)著書

1.	村山正承. Clinical Topics, アイザックス症候群の現状と課題. BIO Clinica 2024年2月号. 膠原病治療と分				
	子標的薬 update. 2024 Jan 12; 39(2): 138-139.				

○神経機能部門

令和 4 (2022) 年度

<研究概要>

我々は、エンドトキシンショックにおいて 2-メチル-2-チアゾリン (2MT) 投与後に循環お よび空腸粘膜血流が改善するという仮説を立てた。本研究では、エンドトキシンショックの ウサギに 2MT を投与した後の全身循環および上腸間膜静脈 (SMV) 血流、腸管血管系の空腸 粘膜組織血流の経時的変化を評価することを目的とした。コントロール群、LPS(1 mg/kg) 群、2MT(80 mg/kg)群、LPS-2MT群を作成し、循環の指標として、0分から240分まで30 分ごとに平均動脈圧、心拍数、心係数、乳酸値、上腸間膜静脈血流量、空腸粘膜組織血流量 を測定した。LPS 群で観察された MAP の低下は、2MT 投与により抑制された。上腸間膜静脈 血流量は、LPS 投与により一時的に低下したが、その後上昇した。LPS 群に 2MT を投与する と、SMV血流量はLPS群よりも早く上昇し始め、その後対照群の値を下回ることはなかった。 LPS 群では、空腸粘膜組織血流量は一時的に減少し、その後増加したが、対照群よりも低い レベルにとどまった。しかし、LPS-2MT 群では、空腸粘膜組織血流量は一時的に減少したが、 その後改善し、対照群のレベルにまで達した。2MT と LPS の相互作用は、空腸粘膜組織血流 において 90 分から 180 分、および 240 分で観察された。2MT は平均動脈圧を維持し、SMV 血 流および空腸粘膜組織血流を改善することが示された。エンドトキシンショックのウサギ モデルにおいて、2MT は平均動脈圧および空腸粘膜組織血流に良好な効果をもたらすことが 明らかになった。

<List of Publication>

- 論文・総説等
- 1. Onoe A, Muroya T, Nakamura F, Ikegawa H, Kuwagata Y, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Effects of 2-methyl-2-thiazoline (2MT) on circulatory dynamics and intestinal vascular system in rabbits with endotoxic shock. *Shock*. 58(4), 341-347 (2022)
- Asaba A, Nomoto K, Osakada T, Matsuo T, Kobbayakawa K, Kobayakawa R, Touhara K, Mogi K, Kikusui T. Prelimbic cortex responds to male ultrasonic vocalizations in the presence of a male pheromone in female mice. *Front Neural Circuit*. 16, 956201 (2022)

②学会発表

【国際学会】

口頭発表

1. 林 勇一郎「海馬 CAI 細胞の活性レベルの時間・文脈依存性」第 45 回日本神経科学 大会, 2022 年 7 月 3 日, 沖縄

【国内学会】

- 1. 小早川 高「嗅覚刺激による恐怖情動の制御」第8回がんと代謝研究会(招待講演)2022年7月19日, 佐渡
- 2. 松尾 朋彦 "Artificial innate fear-evoking odorant actibates a TRIPA1-Sp5/NST-PBN pathway and induces systemic hypothermia, hypometabolism, and hypoxic resistance" 日本味と 句学会第 56 回大会, 2022 年 8 月 22~24 日, 仙台
- 3. 小早川 高「先天的恐怖臭刺激で潜在的な保護作用を誘導する感覚創薬技術」 日本食品免疫学会第18回学術大会(JAFI2022)(招待講演)2022年11月8・9日, 東京
- 4. 松尾 朋彦「Life-protective state induced by artificial innate fear-evoking odorants」第19回国際シンポジウム"味覚嗅覚の分子神経機構"2023年3月18日-19日, 岡山

③著書

1. 小早川高「感覚刺激により潜在的保護能力を誘導する感覚創薬技術」 Clinical Neuroscience vol. 40, No.5, p680-681 (2022)

4)その他

【テレビ放送】

1. NHK サイエンス ZERO 「人間も冬眠できる?もはや SF でない人工冬眠研究~医療や宇宙分野への期待も!」 2023 年 1 月 15 日

令和 5 (2023) 年度

<研究概要>

人間を含め多くの動物は空間感覚、すなわち自分が空間内のどこにいるかを認識する能力を持っている。オキーフらは 1971 年に空間のなかの特定の地点のみで活動する細胞をラット海馬に発見し場所細胞と名付けた。場所細胞は、細胞ごとに活動する地点が異なっており、多数の場所細胞の情報を総合して空間全体を認識していると考えられている。しかし、現実世界の広大な空間を表現するのにニューロンの数は十分なのか、また、空間環境のちがい(例えば違う部屋に入るなど)をどのように表現しているか、といった疑問は解決していなかった。

これらの問いに答えるため、マウスを 4 つの異なる部屋に順次入れて各部屋における海 馬 CA1 細胞の場所細胞活動を記録した。具体的には、海馬 CA1 ニューロンにアデノ随伴ウ イルスベクタを用いてカルシウムセンサー蛋白質 GCaMP6f を発現させ、神経活動に伴うカルシウム濃度変化をマウスの頭に取りつけた超小型顕微鏡 UCLA miniscope v3 にて記録した。1回の記録の度に4部屋から記録を行い、この記録セッションを3日おきに4回行うことで各細胞の活動の長期的な変化も追跡した。その結果、海馬ニューロンの環境(部屋)特異性は1つの部屋でのみ活動する細胞から4つ全ての部屋で活動する細胞まで様々であった。しかも、この「何個の部屋で活動するか」という性質は時間がたっても変化せず細胞ごとに長期間維持されていた。興味深いことに、4つ全ての部屋で活動する細胞の活動は、「部屋」に対する特異性は無いわけだが、「部屋の中のマウスの位置」に対する特異性は高く、かつ時間が経過しても活動の位置選択性は安定に維持されていた。すなわち、場所細胞の場所選択性の広さは細胞ごとに決まっており、広いものから狭いものまでバラエティに富んでいることが判明した。そして、「特定の部屋」のような広い空間を表現する細胞は部屋内の位置に対する特異性は低く、逆に「部屋内の特定の位置」を表現する細胞は部屋に対する選択性が低いことから、これらを組み合わせれば「特定の部屋の特定の一地点を表現することが可能になることがわかった。

我々の住所表記を考えてみると、県・市・町・番地など様々な広さを表す単位を階層的に組み合わせて一地点を表現している。様々な場所が同じ番地を名乗っていても、より広い区画を示す県・市・町などが異なっていれば違う場所であると認識できる。この方法は全ての地点に階層なく別々の名前を付けるよりはるかに効率が良い。脳内の場所表現も同様で、広い空間を表現する細胞から局所を表現する細胞まで多様な細胞を階層的に組み合わせ、少ない細胞数で効率よく空間を表現していると考えられる。

<List of Publication>

- 論文・総説等
- Hayashi Y, Kobayakawa K, Kobayakawa R. The temporal and contextual stability of activity levels in hippocampal CA1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 120 (17), e2221141120 (2023)
- Fujimoto S, Leiwe MN, Aihara S, Sakaguchi R, Muroyama Y, <u>Kobayakawa R</u>, Kobayakawa K, Saito T, Imai T. Activity-dependent local protection and lateral inhibition control synaptic competition in developing mitral cells in mice. *Dev Cell.* 58(14): 1221-1236. e7, 2023
- ② 学会発表

【国際学会】

ポスター発表

1. 林 勇一郎 "The spatial context representation in the medial prefrontal cortex" 第 46 回日本神経科学大会、2023 年 8 月 1 日-4 日, 仙台

2. 松田 烈士、小早川 令子、小早川 高"グリア摂動による新たな休眠様低代謝状態 誘導法の開発" 第 97 回日本薬理学会, 2023 年 12 月 14 日, 神戸

【国内学会】

- 1. 小早川 高「先天的恐怖臭が誘導する人工冬眠・生命保護状態」 大阪大学蛋白質研究所セミナー「脳神経回路の形成・動作と制御の現在と未来」(招 待講演) 2023 年 8 月 24 日, 大阪
- 2. 林 勇一郎 "The organization of spatial coding in the hippocampal CA1 area "生理研シナプス研究会「シナプスで切り開く脳神経機能の理解」 2023 年 10 月 19 日~20 日, 鹿児島
- 3. 小早川 令子 「先天的恐怖臭刺激により人工冬眠・生命保護状態を誘導する感覚医学・創薬技術」第101回日本生理学会大会(招待講演)2024年3月30日,北九州市

③ 著書

- 小早川高「感覚刺激を介した治療薬の創出「感覚創薬」の可能性」 実験医学 vol. 41, No.4, p564-571 (2023)
- 小早川高「先天的恐怖刺激により人工冬眠・生命保護状態を誘導する感覚医学・創薬技術」実験医学 vol. 20, No. 20, p3415-3422 (2023)

○侵襲反応制御部門

令和 4 (2022) 年度

<研究概要>

ロングリードシークエンシングによる高解像度真菌同定

常在微生物が宿主の生理機能や疾患の発症と深く関わることが明らかとなり、生体内の微生物群の全体像を理解するため、より精度の高い解析技術の必要性が高まっている。我々はナノポアシークエンサーを用いて、その最大の利点であるロングリード解析技術を活用し精度の高い微生物同定法の開発を進めてきた。分子系統解析の対象を真菌類へと拡げ、種レベルの菌種判別を可能とする高精度な真菌同定法の確立とその臨床応用を試みた。真菌リボソーム RNA (rRNA)遺伝子中のスペーサー配列である internal transcribed spacer 領域、および大サブユニット rRNA 遺伝子を標的とし、約2,000 塩基を解読可能なアンプリコンシークエンシング技術を確立した。さらに、シークエンスエラーの補正、コンセンサス配列の生成による高精度リードの取得、参照真菌ゲノムデータベースとの照合など、一連のデータ処理の過程をパイプライン化し、高解像度真菌同定ワークフローを構築した。本技術に基づき rRNA 遺伝子を標的とする真菌の系統分類において、ロングリード解析が同定精度の向上に有効であることが示された。

<List of Publication>

①論文・総説等

- 1. Yoshida T, Okumura T, Matsuo Y, Okuyama T, Michiura T, Kaibori M, Umezaki N, Bono H, Hirota K, Sekimoto M. Activation of transcription factor HIF inhibits IL-1beta-induced NO production in primary cultured rat hepatocytes. Nitric Oxide. 2022;124:1-14.
- 2. Matsuo Y. Introducing Thioredoxin-Related Transmembrane Proteins: Emerging Roles of Human TMX and Clinical Implications. Antioxid Redox Signal. 2022;36(13-15):984-1000.
- 3. Omi M, Matsuo Y, Araki-Sasaki K, Oba S, Yamada H, Hirota K, Takahashi K. 16S rRNA nanopore sequencing for the diagnosis of ocular infection: a feasibility study. BMJ Open Ophthalmol. 2022;7(1).
- 4. Kadonosono T, Miyamoto K, Sakai S, Matsuo Y, Kitajima S, Wang Q, Endo M, Niibori M, Kuchimaru T, Soga T, Hirota K, Kizaka-Kondoh S. AGE/RAGE axis regulates reversible transition to quiescent states of ALK-rearranged NSCLC and pancreatic cancer cells in monolayer cultures. Sci Rep. 2022;12(1):9886.
- 5. Ishino M, Omi M, Araki-Sasaki K, Oba S, Yamada H, Matsuo Y, Hirota K, Takahashi K. Successful identification of Granulicatella adiacens in postoperative acute

- infectious endophthalmitis using a bacterial 16S ribosomal RNA gene-sequencing platform with MinION: A case report. Am J Ophthalmol Case Rep. 2022;26:101524.
- 6. Shoji T, Hayashi M, Sumi C, Kusunoki M, Uba T, Matsuo Y, Hirota K. Sevoflurane Does Not Promote the Colony-Forming Ability of Human Mesenchymal Glioblastoma Stem Cells In Vitro. Medicina (Kaunas). 2022;58(11).
- 7. Hashimoto Y, Tsuzuki-Nakao T, Kida N, Matsuo Y, Maruyama T, Okada H, Hirota K. Inflammatory Cytokine-Induced HIF-1 Activation Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Endometrial Epithelial Cells. Biomedicines. 2023;11(1).

②学会発表

- 1. 住吉 麻実, 松尾 禎之, 小谷 唯, 笹田 萌未, 渡邊 利雄, 松田 達志 Arf によるミトコンドリアの機能制御と T 細胞の生存維持 第 31 回 Kyoto T Cell Conference 2022 年5月
- 2. 広田 喜一, 松尾 禎之 クリニカルシーケンシングが拓く集中治療の新展開 日本集中 治療医学会 第6回関西支部学術集会 2022年7月
- 3. 橋本 大輔,高折 綾香,松尾 禎之,松井 雄基,山木 壮,廣岡 智,山本 智久,廣田 喜一,池浦 司,里井 壯平,長沼 誠,関本 貢嗣 切除可能・境界膵癌に対する術前化学療法が腸内細菌叢に与える影響 第60回 日本癌治療学会 2022 年10月
- 4. Maiko Kakita-Kobayashi, Hiromi Murata, Akemi Nishigaki, Naoko Kida, Tomoko Tsuzuki-Nakao, Yoshiyuki Matsuo, Kiichi Hirota, Hidetaka Okada Thyroid hormone facilitates in vitro decidualization of human endometrial stromal cells via thyroid hormone receptors 第65回 日本甲状腺学会学術集会 2022年11月
- 5. 坂口達馬, 橋本大輔, 松尾禎之, 廣田喜一, 里井壯平, 関本貢嗣 超小型ナノポアシークエンサーMinION を用いた急性胆道感染症における起炎菌の同定 第 59 回 日本腹部救急医学会 2023 年 3 月

③著書

- 1. 松尾禎之 (分担執筆) 第1章 8. protocols. io 研究手法のオープン化を加速するオンラインプラットフォーム 実験医学増刊 バイオ DB とウェブツール: ラボで使える最新70選 知る・学ぶ・使う バイオ DX 時代の羅針盤 羊土社 2022 年 11 月
- 2. Yoshiyuki, Matsuo (分担執筆) Full-Length 16S rRNA Gene Analysis Using Long-Read Nanopore Sequencing for Rapid Identification of Bacteria from Clinical Specimens. Nanopore sequencing: methods and protocols. Methods in Molecular Biology Humana Press 2023 年 2 月

令和 5 (2023) 年度

<研究概要>

血中マイクロバイオーム解析に基づく敗血症診断技術開発

敗血症診断においては原因菌の早期同定が治療の要となるが、標準的検査である細菌培養法は迅速性に欠け精度・感度の点でも限界を有する。我々は遺伝子解析における革新的技術であるナノポアシークエンシングを活用し、検体の取得から4時間以内に病原細菌を種レベルで同定する手法を確立した。本技術を基盤とし、血液中に存在する微生物由来DNAの包括的解析法の開発に取り組んだ。遠心分離による細胞成分の濃縮、および混在するヒト由来DNAの分解により、血中細菌DNAの高感度検出に成功した。菌体量の多い糞便や膿等の検体と比較して、血液中に含まれる微量感染微生物の検出には困難を伴うことが多い。生体由来成分の除去による純度の改善、およびヒトゲノムDNAの選択的分解による濃縮を組み合わせることで、血中微生物DNAの効率的検出が可能であることを示した。

<List of Publication>

①論文・総説等

- Takaori A, Hashimoto D, Ikeura T, Ito T, Nakamaru K, Masuda M, Nakayama S, Yamaki S, Yamamoto T, Fujimoto K, Matsuo Y, Akagawa S, Ishida M, Yamaguchi K, Imoto S, Hirota K, Uematsu S, Satoi S, Sekimoto M, Naganuma M. Impact of neoadjuvant therapy on gut microbiome in patients with resectable/borderline resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Pancreatology. 2023.
- 2. Ohta A, Nishi K, Hirota K, Matsuo Y. Using nanopore sequencing to identify fungi from clinical samples with high phylogenetic resolution. Sci Rep. 2023;13(1):9785.

②学会発表

- 1. Junji Yodoi, Akira Yamauchi, Hai Tian, Yoshiyuki Matsuo, Hiroshi Masutani. Lung and Skin/Mucosal Barrier via thioredoxin System. International Meet on Cell Science and Molecular Biology (CSMBMEET 2023) 2023年4月
- 2. 吉田明史, 奥村忠義, 松尾禎之, 奥山哲矢, 道浦 拓, 海堀昌樹, 梅嵜乃斗香, 坊農秀雅, 廣田喜一, 関本貢嗣 転写因子 HIF の活性化はラット初代培養肝細胞における IL-1 誘発の NO 産生を抑制する 第78回 日本消化器外科学会 2023 年7月
- 3. 松尾 禎之 ロングリードシークエンシング技術を活用した高精度な微生物プロファイ リング 第28回 日本フードファクター学会学術集会 2023年11月
- 4. 太田 惇文, 松尾 禎之 ロングリードシークエンシング技術を活用した高精度真菌同 定ワークフローの開発 第 46 回 日本分子生物学会年会 2023 年 12 月

③著書

なし

ゲノム解析部門

<研究概要>

本部門では、ゲノム情報に基づく個別化医療「Precision Medicine」の推進とゲノム医学の発展を目指し、様々な疾患の発症や予後に関連する遺伝的な因子の探索研究を推進している。研究対象は膨大な情報量をもつヒトゲノム全体であり、高度バイオインフォマティクスと統計遺伝学を駆使した包括的な解析アプローチによる疾患の原因解明に取り組んでいる。

I. メンデル型遺伝病の原因変異解析

家族集積性の強い希少難治性疾患を対象に最先端シークエンサーを用いたゲノムシークエンス解析を実施し、遺伝的な原因の解明と遺伝子変異に応じた個別化医療への発展を目指した研究を進めている。

II. ヒトゲノムリファレンスデータベースの構築

厚生労働科学研究費「難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業(疾患群毎の集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究)」の支援を受けて構築した「日本人の遺伝子変異データベース(Human Genetic Variation Database: HGVD)」(http://www.hgvd.genome.med.kyoto-u.ac.jp/)は、2013年の公開以来、アクセス数536万件、データダウンロード数14,597件と、国内外から幅広い支持を得ている。現在、本データベースを拡張するために、日本人約18万人のSNPタイピング情報に基づく集団遺伝学的解析から、日本人集団の遺伝的背景を網羅する3,000人を抽出し、全ゲノムシークエンス解析を進めている。本データベースに集約されるゲノム配列情報は、難病の原因変異やがんのドライバー変異の絞り込みだけでなく、ゲノムワイド関連解析におけるジェノタイプ推定に有用であり、今後のゲノム医学研究や個別化医療の推進において重要な情報源となることが期待される。

III. 抗うつ薬の治療反応予測

マイクロ RNA(miRNA)は、小さな RNA の一種で遺伝子発現を制御し、神経保護やストレス関連反応など、中枢神経系に関連する様々な生物学的プロセスに関与している。本研究では世界で初めて治療前の miRNA の量を厳格な統計手段であるランダム化比較試験を用いて網羅的に解析し、抗うつ薬の治療反応性に関わる miRNA を複数同定した。また、同定した miRNA が作用し得る遺伝子群を推定し、関連する代謝経路を見出した。その経路にはこれまでにうつ病との関連が示唆されている TGF- β pathway、glutamatergic synapse pathway、long-term Depression pathway、MAPK signaling pathway 等が含まれており、うつ病治療の病態生理の理解に役立つものである。うつ病患者の miRNA 情報から抗うつ薬に対する治療反応性が予測可能であることが示され

たことから、今後、精神疾患領域において個に適した治療を選択する個別化医療の進展 に繋がることが期待される。

<プレスリリース>

2022.5.18【関西医科大学】世界で初めて網羅的に miRNA を解析し抗うつ薬の予測に 有用であることを示す

https://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000kr5t-att/20220518Press_Release.pdf

IV. T細胞の前後極性形成メカニズムの解明

細胞の蛍光画像ビッグデータと人工知能による判定から、T 細胞の細胞極性(前後形成)の測定法を確立し、ケモカインによる T 細胞の細胞極性の新規の制御を明らかにした。T 細胞の移動を調節することにより、リンパ球の動態制御による感染症、自己免疫、がん免疫の制御につながる成果と考えられる。

<プレスリリース>

2023.11.9【関西医科大学】低分子 G タンパク Rap1 による T 細胞の前後細胞極性形成メカニズムを発見

https://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000qvyd-att/20231109Press_Release.pdf

V. 川崎病罹患者の腸内細菌叢分析

川崎病に罹患してから約 1 年間が経過した子供の腸内細菌叢を解析し、川崎病の既往がない健康な子供と異なり、腸内細菌叢に特有の乱れが生じていることを発見した。 <プレスリリース>

2023.11.7【関西医科大学】川崎病に罹患後 1 年が経過した子どもの腸内細菌叢の特徴を解明

https://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000qtwg-att/20231107Press_Release.pdf 読売新聞:https://www.yomiuri.co.jp/local/kansai/news/20231216-OYO1T50040/

VI. うつ病における miRNA と mtDNA との関連解析

治療前のうつ病患者の血中の miRNA 発現量と mtDNA コピー数の関連を厳格な統計 手段を用いて網羅的に評価し、うつ病患者の 5 種類の miRNA と mtDNA に関連があることを世界で初めて示した。

<プレスリリース>

2023.9.15 【関西医科大学】世界で初めてうつ病における miRNA と mtDNA との関連を示す

https://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000q6ps-att/20230915Press_Release.pdf

VII. 環境適応に寄与する遺伝形質の探索

低圧低酸素・寒冷等の環境ストレスに対する生理応答の分子機序を解明することは、高血圧や肥満・糖尿病などの遺伝的要因と環境的要因の相互作用で発症するとされる多因子疾患の病因病態解明に役立つと考えられる。これまでに全身・局所的寒冷応答や低圧低酸素応答に関する遺伝形質の同定や分子進化学的解析を進めており、近年は特に、低圧低酸素環境への適応・順応に寄与する遺伝因子に注目している。永続的な低圧低酸素環境に対する生理的適応の遺伝要因を探索するため、標高約3500m~4000mに居住する南米アンデス高地集団およびネパールのチベット高地集団の遺伝多型と生理測定値を用いた関連解析や進化遺伝学的解析を行なっている。また、チベット高地集団の2型糖尿病に関する遺伝リスク予測について、機械学習により精度の高いモデル構築を目指している。更に、低地に定住する我々日本人でも低酸素応答の機構が備わっていることから、その機能的潜在性の遺伝要因を明らかにするため、エピジェネティクスの観点から研究を推進している。

VIII. マラリア原虫の薬剤耐性メカニズムに関する研究

日本医療研究開発機構(AMED)の「新興・再興感染症研究基盤創生事業(多分野融合研究領域)」として、順天堂大学と東京大学との共同研究でマラリア原虫の薬剤耐性メカニズムに関する研究プロジェクトに参加している。マラリア原虫の世代時間は比較的長く、実験室での耐性マラリア株の作製が極めて困難であるため、従来のマラリア薬剤耐性の研究では、未知の耐性原虫の出現を見据えた創薬開発をおこなった例はない。本課題では、DNA変異率を上げることに成功したミューテータマラリアを用い、進化遺伝学とバイオインフォマティクス的手法を駆使した統合的解析によって、原虫が薬剤耐性を獲得するまでの進化過程など、その耐性メカニズムの解明を目指している。現在、栄養体と分裂体の各成長段階における薬剤選択前原虫と薬剤耐性原虫に対する全遺伝子発現変動解析パイプラインを構築し、薬剤耐性に関係するような遺伝子の探索をおこなっている。

IX. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の変異獲得・感染・重症化機構の解明

中華人民共和国武漢より発生したと目される新型コロナウイルス感染症は、突然変異を繰り返しながら感染者を増やし、世界的な感染拡大を引き起こした。当部門では、学内の基礎・臨床部門との連携および東京大学との共同研究により、大阪圏内における SARS-CoV-2 のゲノム解析および進化学的研究を推進してきた。これまでに約 1900 検体の全ゲノム配列を用いて変異株の時空間分布解析や自然選択圧の推定などをおこない、感染拡大過程におけるウイルス変異蓄積の分子機構の解明を目指している。

英文原著

- Hayashi S, Seki-Omura R, Yamada S, Kamata T, Sato Y, Oe S, Koike T, Nakano Y, Iwashita H, Hirahara Y, Tanaka S, Sekijima T, <u>Ito T</u>, <u>Yasukochi Y</u>, <u>Higasa K</u>, Kitada M. OLIG2 translocates to chromosomes during mitosis via a temperature downshift: A novel neural cold response of mitotic bookmarking. *Gene* 891:147829, 2024
- Teramoto Y, Akagawa S, Hori S, Tsuji S, <u>Higasa K</u>, Kaneko K. Dysbiosis of the gut microbiota as a susceptibility factor for Kawasaki disease. *Front Immunol* 14:1268453, 2023
- Pezzotti G, Ohgitani E, Fujita Y, Imamura H, Pappone F, Grillo A, Nakashio M, Shin-ya M, Adachi T, Yamamoto T, Kanamura N, Marin E, Zhu W, Inaba T, Tanino Y, Nukui Y, Higasa K, Yasukochi Y, Okuma K, Mazda O. Raman fingerprints of SARS-CoV-2 Omicron subvariants: molecular roots of virological characteristics and evolutionary directions. ACS Infect Dis 9(11):2226-2251, 2023
- Pezzotti G, Ohgitani E, Imamura H, Ikegami S, Shin-Ya M, Adachi T, Adachi K, Yamamoto T, Kanamura N, Marin E, Zhu W, <u>Higasa K</u>, <u>Yasukochi Y</u>, Okuma K, Mazda O. Raman Multi-Omic Snapshot and Statistical Validation of Structural Differences between Herpes Simplex Type I and Epstein–Barr Viruses. *Int J Mol Sci* 24(21):15567, 2023
- Ogata H, <u>Higasa K</u>, Kageyama Y, Tahara H, Shimamoto A, Takekita Y, Koshikawa Y, Nonen S, Kato T, Kinoshita T, Kato M. Relationship between circulating mitochondrial DNA and microRNA in patients with major depression. *J Affect Disord* 15(339):538-546, 2023
- Funatsuki T, Ogata H, Tahara H, Shimamoto A, Takekita Y, Koshikawa Y, Nonen S, <u>Higasa K</u>, Kinoshita T, Kato M. Changes in Multiple microRNA Levels with Antidepressant Treatment Are Associated with Remission and Interact with Key Pathways: A Comprehensive microRNA Analysis. *Int J Mol Sci.* 30;24(15):12199, 2023
- 7. Ueda H, Tran QTH, Tran LNT, <u>Higasa K</u>, Ikeda Y, Kondo N, Hashiyada M, Sato C, Sato Y, Ashida A, Nishio S, Iwata Y, Iida H, Matsuoka D, Hidaka Y, Fukui K, Itami S, Kawashita N, Sugimoto K, Nozu K, Hattori M, Tsukaguchi H. Characterization of cytoskeletal and structural effects of INF2 variants causing glomerulopathy and neuropathy. *Sci Rep.*

- 8. Ueda Y, <u>Higasa K</u>, Kamioka Y, Kondo N, Horitani S, Ikeda Y, Bergmeier W, Fukui Y, Kinashi T. Rap1 organizes lymphocyte front-back polarity via RhoA signaling and talin1. *iScience* 26(8), 107292, 2023
- 9. Hayashi S, Oe S, Koike T, Seki-Omura R, Nakano Y, Hirahara Y, Tanaka S, Ito T, Yasukochi Y, Higasa K, Kitada M. OLIG2 is an in vivo bookmarking transcription factor in the developing neural tube in mouse. *J Neurochem* 165(3):303-317, 2023
- Kobayashi M, Wakaguri H, Shimizu M, <u>Higasa K</u>, Matsuda F, Honjo T. Ago2 and a miRNA reduce Topoisomerase 1 for enhancing DNA cleavage in antibody diversification by activation-induced cytidine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 120(18), e2216918120, 2023
- Noda Y, Sawada S, Sakagami T, Kojima Y, <u>Higasa K</u>, Tsuta K. Adenoid Ameloblastoma with BRAF p.V600E Mutation Revealing Ameloblastomatous Origin: A First Case Report. *Head Neck Pathol*, 17:788-792, 2023
- 12. Noda Y, Yamaka R, Atsumi N, <u>Higasa K</u>, Tsuta K. Areas of Crush Nuclear Streaming Should Be Included as Tumor Content in the Era of Molecular Diagnostics. *Cancers* 15(6), 1910, 2023
- 13. Ohe C, Yoshida T, Amin MB, Uno R, Atsumi N, <u>Yasukochi Y</u>, Ikeda J, Nakamoto T, Noda Y, Kinoshita H, Tsuta K, <u>Higasa K</u>. Deep learning-based predictions of clear and eosinophilic phenotypes in clear cell renal cell carcinoma. *Mod Pathol* 131, 68-78, 2023
- 14. Miyawaki N, Toyota T, K <u>Higasa K</u>, T Nakamura, Y Furukawa. Successful pregnancy and delivery in a young-onset hypertrophic cardiomyopathy patient with a novel doublet-base substitution in the MYH7 gene. *J Cardiol Cases* 27 (1), 8-11, 2023
- 15. <u>Yasukochi Y</u>, Sera T, Kohno T, Nakashima Y, Uesugi M, Kudo S. Cold-induced vasodilation response in a Japanese cohort: insights from cold-water immersion and genome-wide association studies. *J Physiol Anthropol.* 42(1): 2, 2023

- 16. Yoshioka W, Iida A, Sonehara K, Yamamoto K, Oya Y, Mori-Yoshimura M, Kurashige T, Okubo M, Ogawa M, Matsuda F, <u>Higasa K</u>, Hayashi S, Nakamura H, Sekijima M, Okada Y, Noguchi S, Nishino I. Multidimensional analyses of the pathomechanism caused by the non-catalytic GNE variant, c.620A>T, in patients with GNE myopathy. *Sci Rep*. 12(1):21806, 2022
- 17. Fukui M, Matsuoka Y, Taketani S, <u>Higasa K</u>, Hihara M, Kuro A, Kakudo N. Accelerated Angiogenesis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Under Negative Pressure Was Associated With the Regulation of Gene Expression Involved in the Proliferation and Migration. *Ann Plast Surg* 89(6):e51-e59, 2022
- 18. Ohe C, Yoshida T, Amin M, Atsumi N, Ikeda J, Saiga K, Noda Y, <u>Yasukochi Y</u>, Ohashi R, Ohsugi H, <u>Higasa K</u>, Kinoshita H, Tsuta K. Development and validation of a vascularity-based architectural classification for clear cell renal cell carcinoma: correlation with conventional pathological prognostic factors, gene expression patterns, and clinical outcomes. *Mod Pathol.* 35(6):816-824, 2022
- Kato M, Ogata H, Tahara H, Shimamoto A, Takekita Y, Koshikawa Y, Nishida K, Nonen S, <u>Higasa K</u>, Kinoshita T. Multiple Pre-Treatment miRNAs Levels in Untreated Major Depressive Disorder Patients Predict Early Response to Antidepressants and Interact with Key Pathways. *Int J Mol Sci.* 23(7):3873, 2022
- 20. Saiga K, Ohe C, Yoshida T, Ohsugi H, Ikeda J, Atsumi N, Noda Y, <u>Yasukochi Y</u>, <u>Higasa K</u>, Taniguchi H, Kinoshita H, Tsuta K. PBRM1 Immunohistochemical Expression Profile Correlates with Histomorphological Features and Endothelial Expression of Tumor Vasculature for Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 20;14(4):1062, 2022
- 21. Ohe C, Yoshida T, Ikeda J, Tsuzuki T, Ohashi R, Ohsugi H, Atsumi N, Yamaka R, Saito R, Yasukochi Y, Higasa K, Kinoshita H, Tsuta K. Histologic-Based Tumor-Associated Immune Cells Status in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Correlates with Gene Signatures Related to Cancer Immunity and Clinical Outcomes. *Biomedicines*. 29;10(2):323, 2022

学会発表

- 1. 林真一、関亮平、佐藤勇輝、大江総一,小池太郎、中野洋輔、岩下洸、**伊藤健**、**安河内 彦輝**、**日笠幸一郎**、北田容章. イモリ型脊髄再生における再生遺伝子の特定と原理の解明. 第 129 回日本解剖学会総会・全国学術集会 那覇 2024 年 3 月 21 日
- 2. 小林牧、若栗浩幸、清水正和、**日笠幸一郎**、松田文彦、本庶佑. Activation-induced cytidine deaminase (AID) による免疫記憶形成に必要な Ago2-miRNA 依存的な topoisomerase1 (Top1) の調節機構. 第 46 回日本分子生物学会年会 神戸 2023 年 12 月 6 日
- 3. **安河内彦輝**. 生理人類学と遺伝学との邂逅 ~生理人類学に遺伝学はどう役立つのか? ~. 2023 年度日本生理人類学会フロンティアミーティング 東京 2023 年 11 月 18 日
- 4. **安河内彦輝**、下埜敬紀、神田靖士、上野孝治、宮下修行、甲田勝康、藤澤順一、大隈和、神田晃、西山利正、大橋順、中森靖、**日笠幸一郎**. SARS-CoV-2 全ゲノム分子系統解析に基づく大阪府における変異株の時空間分布. 2023 年度日本生理人類学会フロンティアミーティング東京 2023 年 11 月 18 日
- 5. 島本優太郎、**安河内彦輝**、村瀬雄士、越川陽介、舩槻紀也、緒方治彦、嶽北佳輝、木下利彦、**日笠幸一郎**、加藤正樹. 本邦のうつ病患者における疾患発症、薬物治療反応性に関するゲノムワイド関連解析(GWAS). 第 45 回日本生物学的精神医学会 名護2023 年 11 月 6 日
- 6. 吉田崇、中本喬大、厚海奈穂、大江知里、**安河内彦輝**、蔦幸治、木下秀文. LAG-3/FGL1 の発現は尿路上皮癌における免疫チェックポイント阻害薬の効果と関連する. 第 61 回日本癌治療学会学術集会 横浜 2023 年 10 月 21 日
- 7. 小林 牧、若栗浩幸、清水正和、**日笠幸一郎**、松田文彦,本庶佑. Ago2 と miRNA は AID 依存性の抗体遺伝子組換えにおける DNA 切断を促進するために DNA トポイソメ ラーゼ 1 を減少させる. 第 96 回日本生化学会大会 福岡 2023 年 10 月 31 日
- 8. 島本優太郎、**安河内彦輝**、村瀬雄士、越川陽介、舩槻紀也、緒方治彦、嶽北佳輝、木下利彦、**日笠幸一郎**、加藤正樹. 本邦のうつ病患者における疾患発症,薬物治療反応性に関するゲノムワイド関連解析(GWAS). 第 33 回日本臨床精神神経薬理学会学術集会 愛媛 2023 年 9 月 28 日

- 9. **安河内彦輝**、下埜敬紀、神田靖士、上野孝治、宮下修行、甲田勝康、藤澤順一、大隈和、神田晃、西山利正、大橋順、中森靖、**日笠幸一郎**. ゲノム解析に基づく北河内医療圏における新型コロナウイルス変異株の時空間分布解析. 日本進化学会第 25 回大会沖縄 2023 年 9 月 2 日
- 10. Katano T, <u>Yasukochi Y</u>, Yoshikawa A, Abe M, Sakimura K, <u>Higasa K</u>, Kobayashi T. Transcriptome analyses in the spinal dorsal horn after spared nerve injury (SNI) in the BEGAIN-KO mice. BEGAIN-KO マウス脊髄後角における神経障害性疼痛時の網羅的発現変動分子解析. 第 46 回日本神経科学大会 仙台 2023 年 8 月 2 日
- 11. 島本優太郎、**安河内彦輝**、村瀬雄士、山本敦子、内藤みなみ、越川陽介、舩槻紀也、 緒方治彦、嶽北佳輝、木下利彦、**日笠幸一郎**、加藤正樹. 本邦のうつ病患者における 疾患発症に関するゲノムワイド関連解析(GWAS). 第 20 回日本うつ病学会総会/第 39 回日本ストレス学会・学術総会 仙台 2023 年 7 月 21 日
- 12. **安河内彦輝**、世良俊博、河野太喜、中島悠輔、上杉武蔵、工藤奨. 日本人の寒冷血管 拡張反応時における皮膚血流調節因子のゲノムワイド関連解析. 日本生理人類学会第 84 回大会 福岡 2023 年 6 月 17 日
- 13. **安河内彦輝**. 寒冷曝露時の生理反応に関連する遺伝要因の探索 日本生理人類学会第 84 回大会 フロンティアミーティング・シンポジウム「産熱と断熱 その多様性と遺伝的背景 」.福岡 2023 年 6 月 16 日
- 14. 埜中正博、**日笠幸一郎**、小森裕美子、磯﨑春奈、淺井昭雄. 全ゲノム解析を用いた難治性脳形成障害の遺伝子異常検索. 第 51 回日本小児神経外科学会 栃木 2023 年 6 月 9 日
- 15. 埜中正博、<u>日**笠幸一郎**</u>、小森裕美子、磯﨑春奈、淺井昭雄. 全ゲノム解析にて特定した tubulin 遺伝子の変異を有する難治性脳形成障害. 第 65 回日本小児神経学会学術集会 岡山 2023 年 5 月 26 日
- 16. Yoshida T, Nakamoto T, Ohe C, Ikeda J, <u>Yasukochi Y</u>, Atsumi N, Saito R, Tsuta K, Kinoshita H. LAG-3/FGL1 axis predicts response to immune checkpoint inhibitors in advanced urothelial carcinoma. 米国泌尿器科学会議 (AUA2023) Chicago, USA (30 April 2023)

- 17. 野田百合、澤田俊輔、大江知里、兒島由、<u>日**笠幸一郎**</u>、蔦幸治. 新規 subtype とみなされる BRAF mutation が検出された adenoid ameloblastoma の一例. 第 112 回日本病理学会総会 下関 2023 年 4 月 13 日
- 18. 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、 北田容章. マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入へ向けて. 第 22 回日本再 生医療学会総会 京都 2023 年 3 月 23 日
- 19. 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、 北田容章. マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入へ向けて. 両生類研究セン ターバイオリソース棟落成記念シンポジウム 広島 2023 年 3 月
- 20. 林真一、関亮平、大江総一、小池太郎、中野洋輔、伊藤健、安河内彦輝、日笠幸一郎、 北田容章. マウス脊髄損傷へのイモリ型脊髄再生原理の導入へ向けて. 第 128 回日本解 剖学会総会・全国学術集会 仙台 2023 年 3 月 18 日
- **21. 日笠幸一郎**. この手で行う全ゲノムシークエンスデータ解析 「病原バリアントを探索する」. 日本人類遺伝学会第 67 回大会 横浜 2022 年 12 月 16 日
- 22. Ueda Y, <u>Higasa K</u>, Kamioka Y, Kondo N, Horitani S, Ikeda Y, Fukuhara T, Fukui Y, Kinashi T. Rap1 facilitates cell polarization via RhoA signaling in T cells. 第 51 回日本免疫学会 総会 熊本 2022 年 12 月 9 日
- 23. Teramoto Y, Akagawa S, Akagawa Y, Hori S, Yamanouchi S, Tsuji S, <u>Higasa K</u>, Kaneko K. Gut microbiota as a factor underlying Kawasaki disease susceptibility. International Human Microbiome Consortium 9th Congress. 神戸 2022年11月8日
- 24. 島本優太郎、**安河内彦輝**、村瀬雄士、越川陽介、舩槻紀也、緒方治彦、嶽北佳輝、木下利彦、**日笠幸一郎**、加藤正樹. 本邦のうつ病患者における疾患発症、重症度、薬物治療反応性に関するゲノムワイド関連解析(GWAS). BPCNPNPPP4 学会合同年会 東京 2022 年 11 月 5 日
- 25. 島本優太郎、**安河内彦輝**、村瀬雄士、越川陽介、舩槻紀也、緒方治彦、木下利彦、<u>日笠</u> **幸一郎**、加藤正樹. 本邦のうつ病患者と健常者サンプルを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS). 第 19 回日本うつ病学会総会 大分 2022 年 7 月 14 日

- 26. **安河内彦輝**、西村貴孝、大西真由美、西原三佳、Juan Ugarte、福田英輝、青柳潔. Effect of *EGLN1* genetic polymorphisms on hemoglobin concentration in Andean highlanders. 第 42 回日本登山医学会学術集会 論文奨励賞受賞講演 富山 2022 年 6 月 18 日
- 27. 水野文月、植田信太郎、**日笠幸一郎**、松田文彦、黒崎久仁彦. ゲノムワイドデータからおこなう性別判定. 第 106 回日本法医学会学術全国集会 名古屋 2022 年 6 月 8 日

著書

なし

○ゲノム編集部門

令和 4 (2022) 年度

<研究概要>

遺伝子改変マウスを用いた哺乳類の受精メカニズムの解明

FERLIN タンパク質ファミリーは複数の C2ドメインと C 末端に膜貫通ドメインをもつタンパク質である。最初に同定された FERLIN タンパク質は線虫で発見された Fer-1 タンパク質であり、精子成熟過程において頭部にある membraneous organelles と呼ばれる構造体と細胞膜の融合が起きずに不妊になるということが明らかになっていた。哺乳類の FERLIN ファミリーは 6 種類のタンパク質が同定されていて、筋肉の形成に重要な DYSFERLIN や MYOFERLIN、 聴覚に重要な役割を果たす OTOFERLIN などに関しては機能解析が進んでいるが、FERIL4、 FERIL5、 FERIL6 に関しては解析が進んでいなかった。

まず、3遺伝子の組織における発現を解析すると、いずれも精巣で強く発現する遺伝子であることが明らかになった。そこで、それぞれの遺伝子欠損マウスを作製および表現型解析をすすめると、FER1L5 欠損マウスのみが雄性不妊を示した。FER1L5 は受精に必須の因子であり、精子の頭部に存在する先体と呼ばれる袋状の構造体と細胞膜との膜融合反応である先体反応が起こらないことによって、透明帯通過及び卵子との膜融合に異常が起きることが明らかとなった。FER1L5 は SNARE 複合体の細胞膜のタンパク質である Syntaxin と相互作用することが免疫沈降実験によって明らかとなっており、同じ FERLIN タンパク質ファミリーである OTOFERLIN と同様のメカニズムで機能していると推測され、さらなる詳細なメカニズムの解明が期待できる。また、ショウジョウバエでも、Misfire と呼ばれる FERLIN タンパク質の欠損により不妊が引き起こされることが分かっており、種を超えて保存されている重要な分子機構であることが明らかとなった。

<List of Publication>

①論文·総説等

- 1. Tanaka H, Matsushita H, <u>Tokuhiro K</u>, Fukunari A, Ando Y. Ingestion of Soybean Sprouts Containing a HASPIN Inhibitor Improves Condition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Biology (Basel)*. 12(2):320. 2023
- 2. Morohoshi A, Miyata H, <u>Tokuhiro K</u>, Iida-Norita R, Noda T, Fujihara Y, Ikawa M. Testis-enriched ferlin, FER1L5, is required for Ca2+-activated acrosome reaction and male fertility. *Sci Adv.* 9(4):eade7607. 2023
- 3. Tanaka H, Tokuhiro K. A Haspin promoter element induces tissue-specific

methylation of a transcription region and the regulation of gene expression in mouse ova. *Cell J.* 24(9):552-554. 2022

4. Tanaka H, <u>Nishida-Fukuda H</u>, Wada M, <u>Tokuhiro K</u>, Matsushita H, Ando Y. Inhibitory Effect of the HASPIN Inhibitor CHR-6494 on BxPC-3-Luc, A Luciferase-Expressing Pancreatic Cancer Cell Line. *Cell J.* 24(4):212-214. 2022

②学会発表

1. 小笠原 正人, <u>福田 尚代</u>, 石河 太知, <u>徳弘 圭造</u>, 加茂 政晴, 山田 浩之, 石崎 明 「苦味受容体 1 4 はヒスタミン受容体、E-カドヘリン、N-カドヘリンの発現を制御する」 第 96 回日本薬理学会年会 2022 年 11 月 30~12 月 3 日 横浜

令和5(2023)年度

<研究概要>

遺伝子改変マウスを用いた哺乳類の受精メカニズムの解明

我々は Camerini-Otero らが行った RNA-seq 解析から得られた data の中で精巣内の 5 つの細胞種カテゴリーで高発現する RNA のリストを精査することにより、ドメイン構造や発現パターンから未解明の分子メカニズムの手がかりを得ようと試みた(Margolin G et al., BMC Genomics 2014 15:39)。これらのリストを精査する中で、pachytene 期 spermatocyte で高発現する flippase のファミリーである testis(t)-flippase (*Atp8b5*) と減数分裂期の spermatocyte 以降で高発現する scramblase のファミリーである t-scramblase (*1700057G04Rik*) を発見した。これらはいずれも精巣特異的な発現を示しており、受精の際に重要な役割を果たしていることが予想される。また、t-flippase に関してはすでに先行論文があり、10 回膜貫通型の P4-ATPase であり、特異抗体を用いた染色では精子頭部の先体に局在していることがわかっている(Xu P et al., J Cell Sci 2009 122:2866-76)。この二つの遺伝子により精子細胞膜の脂質局在を変化させることが受精現象に重要な役割を果たしていると考え、生体内における機能解析を進めた。

t-scramblase は、exon4-exon6を含んだゲノム上の領域を deletion した 2 ラインの欠損マウスを作製した。また、t-flippase は genomic DNA の coding regionを含む領域が 103Kb と非常に長いため、膜貫通ドメインの存在する C 末端領域を 11.4Kb ほど deletion したマウスを樹立した。しかしながら、欠損マウス精子の形態・運動性や受精に必要な先体反応も正常に起こることを確認し、人工授精での受精率及び妊孕性を確認したところ欠損マウス精子は正常に受精し、妊孕性にも問題がないことが分かった。このことから t-flippase, t-scramblase はマウスにおいて受精に必須の因子ではないことがわかった。

<List of Publication>

①論文・総説等

1. Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, <u>Tokuhiro K</u>, Ikeda Y, Bergmeier W, Kinashi T. Distinct bidirectional regulation of LFA1 and α 4 β 7 by Rap1 and integrin adaptors in T cells under shear flow. *Cell Rep.* 42(6):112580. 2023

②学会発表

- 1. 田中 宏光,松下 博昭,太田 智絵,福成 温,**徳弘 圭造**,嘉数 圭祐 HASPIN を阻害するクメストロールを多く含む豆モヤシの経口摂取によって、アルツハイマー病モデルマウスの認知症発症は抑制される
- 日本薬学会第 144 年会, 2024年 3月 28日~3月 31日 横浜
- 2. 宮田 治彦, 諸星 茜, <u>徳弘 圭造</u>, 飯田 理恵, 野田 大地, 藤原 祥高, 伊川 正人 マウス FER1L5 は先体反応と雄の妊孕性に重要である
- 第70回日本実験動物学会総会,2023年5月24日~5月26日 筑波
- 3. Pham Anh, 江森 千紘, 山内(石川) 祐, <u>德弘 圭造</u>, 鴨下 真紀, 藤原 祥高, 伊川 正人
- 11 ovary-enriched genes are not essential for female fertility 第 64 回日本卵子学会学術集会, 2023 年 5 月 20 日~5 月 21 日 筑波

○がん生物学部門

令和3 (2021) 年度、令和4 (2022) 年度

<研究概要>

Mint3 阻害低分子化合物の探索と検証

これまでの我々の研究から、Mint3 は低酸素応答性の転写因子 HIF-1 を通常酸素下で活性化 することで、がんの進展や炎症を促進することが明らかになってきた。一方で Mint3 欠損マ ウスは通常飼育下において明らかな異常を示さないことから、Mint3 阻害剤は重篤な副作用 を回避しつつがんや炎症性疾患の治療に有効である可能性が高い。そこで我々は化合物ア レイを用いて Mint3 結合化合物の探索を行い、ヒット化合物の構造類縁体の中から Mint3 阻 害活性を持つ naphthofluorescein (以下 Naph)を同定した。Naph はヒト線維肉腫 HT1080 細胞において、Mint3 依存的な HIF-1 転写活性を阻害し、HIF-1 標的遺伝子の発現を抑制し た。また、ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞およびマウス骨髄由来マクロファージにおいて、Naph 添加により解糖系最終代謝産物である乳酸の産生が Mint3 依存的に抑制された。 次に、マウ ス個体に対する Naph の毒性について解析を行ったが、体重減少や血液の生化学検査および 主要臓器の組織学解析の異常は見られなかった。続いて、Naph 投与による抗腫瘍効果を検 討した。マウス乳がん E0771 細胞の B6 マウス皮下移植モデルにおいて、Naph 投与は著しく 腫瘍増殖を抑制した。E0771 腫瘍組織の免疫染色を行った結果、Naph 投与群では腫瘍中の CD8+T 細胞が顕著に増加していた。そこで、獲得免疫系が機能しない nude マウスに E0771 細胞を移植し Naph 投与を行ったところ、Naph 投与により腫瘍増殖は抑制されたが、B6 マ ウスの実験に比べて抑制効果は穏やかであった。次に、ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞および ヒト膵がん細胞 AsPC-1 細胞のヌードマウス皮下移植モデルに対する Naph の効果を検証し た。単剤では抗腫瘍効果が認められない投与濃度・頻度で細胞傷害性抗がん剤と Naph の併 用を行ったところ、MDA-MB-231 と AsPC-1 腫瘍の両者で、細胞傷害性抗がん剤と Naph の併 用で有意な腫瘍増殖抑制効果が示された。Mint3 は炎症性モノサイトの活性化を介してがん 転移を促進する(Hara T et al., PNAS, 2017)。そこで、Naph 投与により転移が抑制される か、マウスメラノーマ B16F10 細胞の実験的肺転移モデルで検証を行った。その結果、Naph 投与は野生型マウスでは B16F10 細胞の肺転移を Mint3 KO マウスと同程度にまで抑制した が、Mint3 KO マウスに対しては転移抑制効果を示さなかった。最後に、LPS 誘導エンドトキ シンショックモデルに対する Naph の効果を検証した。その結果、Naph 投与により野生型マ ウスでは LPS 投与による血中の炎症性サイトカインレベルの上昇が抑制され、生存率が Mint3 KOマウスと同程度にまで回復した。また、骨髄由来マクロファージを用いた in vitro の解析により、Naph 処理により LPS 応答性の炎症性サイトカイン産生が Mint3 欠損マクロ ファージと同程度にまで抑制された。以上の結果より、Mint3 阻害化合物はがんや炎症性疾 患の抑制に有効であることが示された。上記の結果について、Communications Biology誌 に論文を発表、プレスリリースを行い、薬事日報にて紹介記事が掲載された(「癌の転移・

増殖抑える物質発見 2 万超える化合物から同定 関西医大グループ」,薬事日報,2021/10/20)。

尿路上皮がんにおける Mint3 の発現と機能の解明

膀胱がんは泌尿器系で最もよく見られるがんであり、2020年には世界で57万3千人が新規 に膀胱がんと診断され、21 万人が膀胱がんで亡くなっている。膀胱がんの 90%以上が尿路上 皮がんの組織型を示し、治療にはシスプラチン・ゲムシタビンなどの細胞傷害性抗がん剤が 長らく使用されてきたが、治療成績は芳しくなかった。近年、免疫制御薬や分子標的治療薬 が尿路上皮がんに対して適用され、一部には治療成績の改善がみられたが未だに多くの制 限があるため、既存治療薬とは作用機序の異なる新たな治療標的が切望されている。そこで 我々は、本学腎泌尿器外科学講座、病理学講座との共同研究で尿路上皮がんにおける Mint3 の発現と機能の解明を行った。臨床検体を用いた免疫組織化学染色解析では上部尿路上皮 がんと膀胱がんの 2 つの異なるコホートにおいて Mint3 高発現は予後不良と相関すること が明らかとなった。そこで、Mint3が実際に尿路上皮がんの悪性形質に寄与しているかにつ いて、ヒト膀胱がん細胞株を用いて検討を行った。まず、Mint3 に対する shRNA を安定発現 するレンチウイルスベクターをヒト膀胱がん細胞株に導入し、Mint3 ノックダウン(KD)細胞 を作製し、細胞機能について解析した結果、膀胱がん細胞ではMint3 KD により HIF-1 転写 活性が低下し、解糖系機能、コロニー形成能、細胞運動・浸潤能が低下した。続いてヒト膀 胱がん RT112 細胞の nude マウス皮下移植実験を行ったところ、Mint3 KD により腫瘍増殖が 有意に抑制された。Mint3 KD 細胞の腫瘍組織ではHIF-1 標的遺伝子の発現が低下し、腫瘍 血管(CD31)と細胞増殖(Ki67)マーカー陽性細胞の減少およびアポトーシス(cleaved caspase-3)マーカー陽性細胞の増加が観察された。次に RT112 腫瘍に対して、細胞傷害性抗 がん剤ゲムシタビンと Mint3 阻害剤 Naph の投与実験を行った。その結果、ゲムシタビンと Naph の併用は他群に比べて有意に腫瘍増殖を抑制した。Naph とゲムシタビン併用の上乗せ 効果について検討を行った結果、腫瘍血管や細胞増殖には特に上乗せ効果が見られなかっ た一方、アポトーシスマーカーについては併用により顕著に増加が認められた。以上の結果 から、尿路上皮がんにおいて Mint3 は予後不良因子であり、治療標的になり得ることが明ら かとなった。

<List of Publication>

論文・総説等

原著論文

Ozato Y#, Kojima Y#, Kobayashi Y, Hisamatsu Y, Toshima T, Yonemura Y, Masuda T, Kagawa K, Goto Y, Utou M, Fukunaga M, Gamachi A, Imamura K, Kuze Y, Zenkoh J, Suzuki A, Niida A, Hirose H, Hayashi S, Koseki J, Oki E, Fukuchi S, Murakami K, Tobo T, Nagayama S, Uemura M, <u>Sakamoto T</u>, Oshima M, Doki Y,

- Eguchi H, Mori M, Iwasaki T, Oda Y, Shibata T, Suzuki Y, Shimamura T*, Mimori K*. Spatial and single-cell transcriptomics decipher the cellular environment containing HLA-G+ cancer cells and SPP1+ macrophages in colorectal cancer. *Cell Rep.* 42(1):111929, 2023.
- Ikeda J#, Ohe C#, <u>Tanaka N</u>#, Yoshida T, Saito R, Atsumi N, Kobayashi T, Kinoshita H, Tsuta K, <u>Sakamoto T*</u>. Hypoxia inducible factor-1 activator munc-18-interacting protein 3 promotes tumour progression in urothelial carcinoma. *Clin Transl Discov.* 3, e158, 2023.
- 3. Yamada T, Saitoh Y, Kametani K, Kamijo A, <u>Sakamoto T</u>, Terada N*. Involvement of membrane palmitoylated protein 2 (MPP2) in the synaptic molecular complex at the mouse cerebellar glomerulus. *Histochem Cell Biol*. 158(5):497-511, 2022.
- 4. Kasai Y, Gan SP, Funaki T, Ohashi-Kumagai Y, Tominaga M, Shiu SJ, Suzuki D, Matsubara D, <u>Sakamoto T</u>, Sakurai-Yageta M, Ito T, Murakami Y*. Transhomophilic interaction of CADM1 promotes organ infiltration of T-cell lymphoma by adhesion to vascular endothelium. *Cancer Sci.* 113(5):1669-1678, 2022.
- 5. Liu X, Sato N, Shimosato Y, Wang TW, Denda T, Chang YH, Yabushita T, Fujino T, Asada S, Tanaka Y, Fukuyama T, Enomoto Y, Ota Y, <u>Sakamoto T</u>, Kitamura T, Goyama S*. CHIP-associated mutant ASXL1 in blood cells promotes solid tumor progression. *Cancer Sci.* 113(4):1182-1194, 2022.
- 6. Ten T, Nagatoishi S, Maeda R, Hoshino M, Nakayama Y, Seiki M, <u>Sakamoto T</u>, Tsumoto K*. Structural and thermodynamical insights into the binding and inhibition of FIH-1 by the N-terminal disordered region of Mint3. *J Biol Chem.* 297(5):101304, 2021.
- 7. <u>Sakamoto T</u>*, Fukui Y, Kondoh Y, Honda K, Shimizu T, Hara T, Hayashi T, Saitoh Y, Murakami Y, Inoue JI, Kaneko S, Osada H, Seiki M. Pharmacological inhibition of Mint3 attenuates tumour growth, metastasis, and endotoxic

shock. *Commun Biol*. 4(1):1165, 2021.

総説

1. <u>Tanaka N</u>, <u>Sakamoto T</u>*. Mint3 as a Potential Target for Cooling Down HIF-1 α - Mediated Inflammation and Cancer Aggressiveness. *Biomedicines*. 11(2):549, 2023.

② 学会発表

- 1. <u>Noritaka Tanaka</u>, <u>Takeharu Sakamoto</u>, The collateral effects of KRAS inhibitors on tumor microenvironment, The 26th JFCR—ISCC, 2022 年
- 2. <u>田中伯享</u>, <u>坂本毅治</u>、がんにおける低酸素応答関連因子に対する KRAS 阻害剤の影響、 第 45 回日本分子生物学会年会、2022 年
- 3. <u>坂本毅治</u>, <u>田中伯享</u>, 山口貴世志, 松原大祐, 古川洋一、Mint3 の抑制は in vivo でトリプルネガティブ乳がんを化学療法感受性にする、第 45 回日本分子生物学会年会、2022 年
- 4. 金森茜,村上善則,井上純一郎,<u>坂本毅治</u>、Mint3 は膵癌で HIF-1 を介して SKP2 を制御する、第81回日本癌学会学術総会、2022 年
- 5. 池田純一, <u>田中伯享</u>, 齊藤亮一, 小林恭, 木下秀文, <u>坂本毅治</u>、Mint3 は尿路上皮癌 における予後不良因子である、第 81 回日本癌学会学術総会、2022 年
- 6. 笠井優, <u>坂本毅治</u>, 伊東剛, 村上善則、T 細胞リンパ腫と血管内皮細胞間における細胞接着分子 CADM1 のトランス・ホモ結合は臓器浸潤を促進する、第 81 回日本癌学会学術総会、2022 年
- 7. 田中伯享, <u>坂本毅治</u>、KRAS 阻害剤ががん微小環境のリプログラミングにおよぼす影響 に関する解析、第81回日本癌学会学術総会、2022 年

- 8. 岡田光,山下太郎,<u>坂本毅治</u>,金子周一、Mint3 は高分化型 AFP 陰性肝細胞癌に対する 新規治療標的因子になり得る、第81 回日本癌学会学術総会、2022 年
- 9. <u>坂本毅治</u>, <u>田中伯享</u>, 山口貴世志, 松原大祐, 古川洋一、Mint3 阻害は in vivo でトリプルネガティブ乳がんを化学療法感受性にする、第 81 回日本癌学会学術総会、2022 年
- 10. <u>坂本 毅治</u>, <u>田中 伯享</u>、化学療法誘導性肺転移の新規メカニズム、第 31 回日本がん転 移学会学術集会・総会、2022 年
- 11. <u>田中伯享</u>, <u>坂本毅治</u>、KRAS 阻害剤に対する耐性と転移能に関する解析、第 31 回日本がん転移学会学術集会・総会、2022 年
- 12. <u>田中伯享</u>, <u>坂本毅治</u>、KRAS 阻害剤ががん微小環境に与える影響に関する検討、第 26 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2022 年
- 13. <u>坂本毅治</u>, 植松崇之、酸素センシング機構によるマクロファージ機能制御のがん、炎症性疾患における役割、第32回日本サイトメトリー学会学術集会、2022年
- 14. 植松崇之, 土屋晃介, 小林憲忠, <u>坂本毅治</u>、Listeria monocytogenes 感染における HIF-1 活性化因子 Mint3 を介した宿主応答機構の解析、第 95 回日本細菌学会総会、 2022 年
- 15. <u>坂本毅治</u>, 福井 優也, 近藤 恭光, 本田 香織, 清水 猛, 原 敏朗, 林 哲郎, 齊藤 百 合花, 村上 善則, 井上 純一郎, 金子 周一, 長田 裕之, 清木 元治、Mint3-FIH-1 相 互作用の薬理的阻害は腫瘍の増殖、転移、エンドトキシンショックを減弱させる、第 44 回日本分子生物学会年会、2021 年
- 16. 植松崇之, 土屋晃介, 小林憲忠, 清木元治, 井上純一郎, 金子周一, <u>坂本毅治</u>、 Listeria monocytogenes 感染における HIF-1 活性化因子 Mint3 を介した宿主応答機構 の解析、第 44 回日本分子生物学会年会、2021 年

- 17. <u>坂本毅治</u>、がん微小環境の酸素センシング機構を標的とした創薬研究、第80回日本癌 学会学術総会、2021 年
- 18. <u>坂本毅治</u>、宿主 Mint3 は肺において化学療法誘導性前転移ニッチ形成を促進する、第 30 回日本がん転移学会学術集会・総会、2021 年

③ 著書

1. <u>坂本毅治</u>, MMP を標的としたがん微小環境改変治療法の可能性 実験医学増刊 Vol. 39 No. 12 「がん微小環境に 1 細胞レベルで挑む」 羊土社, 2021.

令和5(2023)年度

<研究概要>

Mint3によるトリプルネガティブ乳癌の薬剤抵抗性機構の解明

トリプルネガティブ乳がんは、ホルモン受容体やHER2というタンパクの発現がみられない タイプの乳がんで、乳がん全体の 15-20%を占める。トリプルネガティブ乳がんはホルモン 受容体や HER2 といった治療標的となり得るタンパクを発現していないため、トリプルネガ ティブ乳がんの治療には細胞傷害性抗がん剤を用いた化学療法が用いられる。しかしなが ら、トリプルネガティブ乳がんは高い再発率と再発後の急速な進行を示すため化学療法に よる最終的な治療成績は芳しくない。また、一般的に抗がん剤のスクリーニングで用いられ る細胞培養実験でトリプルネガティブ乳がんに効果を示した抗がん剤が、生体ではそれほ ど効果を示さないことがある。トリプルネガティブ乳がんの化学療法に対する抵抗性には 様々なメカニズムが関わっており、このことがトリプルネガティブ乳がんの治療を困難に していると考えられる。通常の細胞培養の環境と異なり、生体ではがんは酸素や栄養が限ら れた厳しい環境にある。そこで、本研究では細胞内酸素センサーの調節に関わりがんの悪性 化を促進する Mint3 に着目し、トリプルネガティブ乳がんで Mint3 の発現を抑えた際に抗 がん剤への抵抗性が変化するかについて細胞培養実験とマウスへの腫瘍移植実験で解析を 行った。その結果、細胞培養実験では Mint3 の発現を抑えても抗がん剤への抵抗性は変化し なかったが、マウスに移植した腫瘍では Mint3 の発現を抑えることで、細胞傷害性抗がん剤 のドキソルビシン、パクリタキセルに対する抵抗性が減少し、化学療法によりトリプルネガ ティブ乳がん腫瘍の増殖を顕著に抑制出来ることを見出した。

そこで Mint3 を抑えることでトリプルネガティブ乳がん腫瘍の中でどのような変化が起こるかについて遺伝子発現解析を行ったところ、マウスに移植したトリプルネガティブ乳がん腫瘍で Mint3 を抑えると、HSP70 などストレス耐性に関わる遺伝子の発現の低下が観察

された。さらに、ヒトのトリプルネガティブ乳がん手術検体でも Mint3 の発現と HSP70 の発現が正に相関すること、HSP70 を阻害することで Mint3 を抑えた時と同様に抗がん剤がトリプルネガティブ乳がん腫瘍に効きやすくなることを明らかにした。続いて、なぜトリプルネガティブ乳がん腫瘍で Mint3 を抑制すると HSP70 などの発現が低下するかについてメカニズムの詳細な解析を行った。Mint3 は低酸素に適応する際に重要な役割を果たす HIF-1 という転写因子を活性化し、解糖系と呼ばれる酸素に依存しないエネルギー代謝を促進することが知られる(Tanaka N et al., Biomedicines, 2023)。代謝産物の解析を行った結果、トリプルネガティブ乳がんは酸素・栄養の豊富な培養液中にいる状態に比べ、生体ではより解糖系に依存して細胞のエネルギー源である ATP を作っており、Mint3 を抑えることでトリプルネガティブ乳がんの ATP レベルが顕著に低下することが明らかとなった。この ATP レベルの低下により、トリプルネガティブ乳がん腫瘍では AMPK の活性化および mTOR シグナルの低下が起き、mTOR シグナルにより活性化され HSP70 などのストレス耐性遺伝子の発現を促す転写因子 HSF-1 の活性が低下し、HSP70 の発現が低下することが明らかとなった。

本研究により、これまでトリプルネガティブ乳がんの生体での抗がん剤抵抗性について、エネルギー代謝が重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、その制御に Mint3 が関わり、Mint3 を抑えることで、化学療法に抵抗性を示すトリプルネガティブ乳がんを化学療法が効くように変化させることが出来ることが分かった。今回の発見により、Mint3 を標的とした薬剤やその下流のイベントに関わる分子の阻害剤と細胞傷害性抗がん剤を併用することで、より効果的なトリプルネガティブ乳がんの治療法の開発が期待される。上記の結果について、Cell Death & Disease 誌に論文を発表、プレスリリースを行い、日経バイオテク ONLINE (2023/12/18)、 QLifePro (2023/12/27)、日本経済新聞 (2023/12/29)にて紹介記事が掲載された。

<List of Publication>

論文·総説等

原著論文

- <u>Tanaka N</u>[#], Okada H[#], Yamaguchi K, Seki M, Matsubara D, Gotoh N, Suzuki Y, Furukawa Y, Yamashita T, Inoue J, Kaneko S, <u>Sakamoto T</u>*. Mint3-depletion-induced energy stress sensitizes triple-negative breast cancer to chemotherapy via HSF1 inactivation. *Cell Death Dis*. 14, 815, 2023.
- 2. Tabata S*, Kojima Y, <u>Sakamoto T</u>, Igarashi K, Umetsu K, Ishikawa T, Hirayama A, Kajino-Sakamoto R, Sakamoto N, Yasumoto KI, Okano K, Suzuki Y, Yachida S, Aoki M, Soga T*. L-2hydroxyglutaric acid rewires amino acid metabolism in colorectal cancer via the mTOR-ATF4 axis. *Oncogene*. 42, 1294-1307, 2023.

総説

- <u>Tanaka N</u>*, <u>Sakamoto T</u>*. MT1-MMP as a Key Regulator of Metastasis. *Cells*. 12, 2187, 2023.
- 2. <u>田中 伯享</u>*, <u>坂本 毅治</u>. RAS 遺伝子を中心としたがん治療戦略の確立. *生体の科学*, Vol. 74 No. 4 p289-294, 2023.
- 3. <u>坂本 毅治</u>*, <u>田中 伯享</u>, 植松 崇之. マクロファージにおける酸素センシング機構調節分子 Mint3 の炎症性疾患・がんでの役割. **サイトメトリーリサーチ**, 32 巻 2 号 p. 1-9, 2023.

② 学会発表

- 1. <u>田中伯享</u>, <u>坂本毅治</u>、KRAS 阻害剤による HIF-1A の発現制御機構、第 46 回分子生物学 会年会、2023 年
- 2. <u>坂本毅治</u>、細胞内酸素センシング調節機構を標的としたがん・炎症の制御、第 64 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2023 年
- 3. <u>田中伯享</u>, <u>坂本毅治</u>、KRAS 阻害剤に対する耐性化と EMT に関する解析、第 32 回日本がん転移学会学術集会・総会、2023 年
- 4. <u>田中伯享</u>, <u>坂本毅治</u>、KRAS 阻害剤による HIF-1 α 発現制御メカニズム、第 27 回に日本がん分子標的治療学会学術集会、2023 年
- 5. <u>Noritaka Tanaka</u>, <u>Takeharu Sakamoto</u>. The potential effect of KRAS inhibitors on tumor microenvironments. AACR-NCI-EORTC INTERNATIONAL CONFERENCE ON MOLECULAR TARGETS AND CANCER THERAPEUTICS 2023, 2023 年

○綜合研究施設

関西医科大学附属生命医学研究所綜合研究施設(以下綜研)は、平成25年4月の枚方学舎移転後、臨床系綜合研究施設(以下臨床系綜研)を新設し、運営してきた。臨床系綜研の責任者が副施設長を兼ねること、綜研の利用代表者は施設を利用する各講座・部門・教室等部署の教授又は所属長により推薦された代表者とすること、綜合研究施設運営委員会(施設長・副施設長・生体情報部門長と、大学院医学研究科委員会の互選による委員2名、臨床系綜研連絡会で選出された委員1名、専門性を鑑みて施設長が指名する委員1名、利用代表者会議で選出された委員2名、事務長)が予決算、運営に関わる制度の改廃、利用規則違反者の措置及び利用代表者会議で必要とされた審議事項の審議を行うこと、綜合研究施設利用代表者会議(綜研運営委員会の構成員と利用代表者)において施設の利用及び管理運営について協議及び審議し、必要と認めたものについては運営委員会の審議に付するための提案をすることはこれまでどおりである。なお規定改定により、令和2年度以降事務長は研究部部長が兼ねることとなった。

組織の変遷 (平成29年度以降)

施設長 平成 26 年度~令和元年度 赤根敦

令和2年度~ 小林拓也

副施設長 平成 25 年度~至現在 伊藤量基

生体情報部門長 平成 23 年度~至現在 松田達志

大学院医学研究科委員会の互選による委員

令和元年度 小林拓也 人見浩史

令和2年度 人見浩史 木梨達雄

令和3年度~令和4年度 人見浩史 六車恵子

令和5年度~ 人見浩史 大隈和

臨床系綜研連絡会で選出された委員

平成 26 年度~ 塚口裕康

利用代表者会議で選出された委員

令和元年度~令和2年度 日笠幸一郎 神田晃

令和3年度 海堀昌樹 小原圭吾

令和 4 年度 海堀昌樹 坂本毅治

令和5年度 佐竹敦志 松浦徹

事務長 平成27年度~令和元年度 阪井保博

令和2年度~令和5年度 奥田耕市

齊藤育、權田裕之、宮田かほるの3名の技師が機器の維持・管理、利用者への使用方法 説明等の業務にあたっている。平成25年6月~令和5年12月坂田喜子が研究支援者と して職務にあたっていた。令和 5 年度 5 月より研究支援者・谷川佑加理が着任。FCM 装置の管理運営業務を担当。光顕及び電顕の標本作製、セルソーターによる細胞解析、DNAシーケンス等の受託業務は従来通り各担当技師が行っている。平成 26 年度 RI 施設に導入された SPECT-CT の非 RI サンプルの測定と平成 28 年度導入された 3D プリンター装置のサポートを坂田がサポートしていた。令和 4 年度に綜研内モニターシステムを導入し、火災や事故等の発生にいち早く気付けるようにした。令和 5 年度に機器予約システムを導入し、研究者が自席もしくはモバイル端末から機器の使用予約ができるようにした。

予決算

令和元年度は32,107,000 円。令和2、3 年度は32,187,000 円。令和4 年度予算はDNAシーケンサー・FCM 解析装置更新費用30,000,000 円を含む62,257,000 円。令和5 年度予算は安全キャビネット点検費用・新規機種購入費用等を含む38,294,000円。

		令和元年度	令和2年度	令和3年度	令和4年度	令和5年度
運営費	消耗品費	13, 593, 724	14, 998, 164	14, 500, 000	13, 725, 801	9, 952, 245
	修繕費	8, 130, 087	10, 826, 230	7, 500, 000	7, 016, 993	8, 072, 350
	業務委託費	6, 058, 820	5, 764, 550	6, 200, 000	6, 381, 680	8, 843, 725
	その他支出	2, 160	0	0	3, 636	34, 510
	戻入金	-9, 646, 473	-10, 231, 824	-7, 000, 000	-6, 627, 092	-6, 671, 785
	小計	18, 138, 318	21, 357, 120	21, 200, 000	20, 501, 018	20, 231, 045
機器備品費	Ť	8, 648, 686	10, 829, 760	9,670,000	40, 341, 576	16, 626, 819
執	行額合計	26, 787, 004	32, 186, 880	30, 870, 000	60, 842, 594	36, 857, 864

機器設備の整備

	設備名/機器名		システム総額	綜研負担額
	ケミルミイメージングシステム 一式			3, 102,
	万能核酸精製装置			2, 156,
令和元年度	バイオハザードセイフティキャビネット	- 綜研機器備品費		1, 219,
11111111111尺	スライドレスセルカウンター	MY 10 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		988,
	MSシステムLegacyパッケージ 一式			874,
	CT画像解析用PC			306
	スイングローター P40ST	綜研機器備品費		2, 191
令和2年度	倒立型リサーチ顕微鏡システム IXドラゴンフライシステム	R2年度文科省1/2助成	69, 534, 300	大字負担 34,767
	Attune NxT フローサイトメーターアップグレード	R2年度文科省2/3助成	11, 820, 930	4, 773
	IMARIS upgrade	炒缸继兜借 中弗		3, 707
△和9年度	高機能高速冷却遠心機 Avanti JXN-30	际		3, 498
7 和3 千茂	単一細胞解析システム	P3年度立利公9/3助成	7, 425, 000	2, 475
		NOT/及人作目2/ 03/JIX	1, 420, 000	2,410
	ジェネティックアナライザ 3500			17, 446
	Arm the role the late on a	_		11, 110
	細胞喉砕機 Picoruptor			4, 092
	オーバーヘッドフターラー	■ 	1	282
				12, 512
		┪		2, 999
△和4年度		Ⅎ		1, 155
令和4年度		令和4年度私学助成予算		1, 854
. 16 - 1 - 0	agree / V V V E District P	令和4年度私学助成予算		1, 505
	所具八七壮男 0.1:1	間接経費	00 001 000	
	貝里刀勿表但 Urbitrap	各講座拠出金	83, 061, 000	1
		以上により購入		
				6, 251
		間接経費		12, 868
Attune NxT フローサイトメーターアップグレード R2年度文料省2/3助成 IMARIS upgrade 高機能高速冷却遠心機 Avanti JXN-30 年 和		52, 404		
		光免疫医字研究所予算		0.00
		_		2, 324
		少		725 2, 170
				4, 811
		-		589
		<u> </u>		303
		R5年度文科省2/3助成	18, 018, 000	6,006
	3Dデコンボリューション	10 1 (2) 11 11 11 11 11	10,010,000	3,000
△和5年 中	高精度ハイスループット分子間相互作用解析	DE 左连 本科 / 2 1 / 0 叶 - 2	00 100 000	
〒和3平皮	Octet RH96	K5年度又科有1/2助成	82, 183, 002	
	共焦点レーザー顕微鏡 FV4000RS			39, 363
	走査電顕			
		1		59, 400
		間接経費		
	Attune upgrade	阿灰紅魚		12, 743
	Yellow/Violet Lazer AutoSampler	_		
	プレートリーダー VarioskanLUX	_		5, 252
	什器	1	1	584

令和元年度: 綜研機器備品費により細胞培養室 (P2室)の安全キャビネット、ケミルミイメージングシステム FUSION solo S、質量分析器 API3200の PC システムを更新した。次世代シークエンサーについては、平成30年度導入のillumina社 Miseq と、従前から設置の Thermo Fisher Scientific社 Ion PGM System、また法医学講座購入の Thermo Fisher Scientific社 Ion GeneStudio S5の3機種体制となり、利用者のニーズに合わせた選択が可能となった。綜研機器備品費により、バイオハザードセイフティキャビネット・ケミルミイメージングシステム・LC/MSシステム制御 PC・CT 画像解析用 PCの更新、万能核酸精製装置・スライドレスセルカウンターの新規導入を行った。

令和2年度:令和2年度文科省1/2助成により倒立型リサーチ顕微鏡システム、令和2年度文科省2/3助成によりAttune NxTフローサイトメーターアップグレードが導入された。機器備品費により超遠心機用アングルローターを購入した。

令和3年度: 令和2年度文科省2/3助成により単一細胞解析システムを導入した。機器備品費によりImarisのupgrade及び高機能高速冷却遠心機の更新を行った。

令和4年度:機器備品費によりDNAシーケンサー・細胞解析機2台の増設を含む7件の機器更新等を行った。令和4年度私学助成予算・間接経費・各講座拠出金により質量分析装置Orbitrapが設置された。間接経費により、バーチャルスライドシステムVS200等2件の機器導入及び1件のバージョンアップが行われた。

令和 5 年度: R5 年度文科省 1/2 助成により高精度ハイスループット分子間相互作用解析 Octet RH96 の導入、R5 年度文科省 2/3 助成により共焦点レーザー走査型顕 微鏡 FV3000 用多色レーザー・検出器増設が行われた。綜研機器備品費によりリアルタイム PCR・FUSION solo S 蛍光アップグレード含む 5 件の機器更新等を行った。間接経費により走査電顕・共焦点レーザー顕微鏡の導入を含む 5 件の装置の導入もしくはアップグレードが行われた。

綜研利用登録者数の変遷と主な装置の使用状況

	令和元年度	令和2年度	令和3年度	令和4年度	令和5年度
登録者数	395	402	389	406	410
登録者中 大学院生 (博士課程・修士課程)	68	70	77	91	87
登録者中 学部学生 (医学部・リハ学部・看護学部)	29	38	25	26	22

主な装置について、設置場所別に過去 10 年の使用実績を別表に示した。表に示されている以外にも綜研は多数の機器を所有している。

購入年度	設備名	設置場所	2014年度~2023年度 (H26~R5) までの使用累計回数
H26	MACS組織細胞精製システム	オープンラボ1	397
H28	(AutoMacsPRO GentleMacs) 3Dプリンターシステム	オープンラボ1	290
H27	(EDEN260VS) 遺伝子解析装置	オープンラボ1	99
H23	(nCounter DX Analysis System-FLEX) MALDI-IT-TOF型顕微質量分析装置	質量顕微鏡室	966
H21	(質量顕微鏡特型機) トータル細胞可視化解析システム	多光子顕微鏡室	513
H24	(FV1000) 高度細胞機能解析蛍光イメージングシステム	生体分子イメージング室	166
H23	(ArrayScan) HSオールインワン顕微鏡	生体分子イメージング室	1396
H24	(BZ9000) 高度細胞機能解析蛍光イメージングシステム	生体分子イメージング室	336
H23	(ImageStreamX MkII) 近赤外蛍光イメージャー	生体分子イメージング室	487
	(Odyssey Sysytem) マルチモードプレートリーダー		
R1	(EnSight) 高速蛍光イメージシステム	蛍光定量イメージング室	156
H22	(AF6500) レーザーキャプチャーマイクロダイセクションシステム	光学顕微鏡室	806
H24	(ArcturusXT) 共焦点レーザー走査型顕微鏡	光学顕微鏡室	62
H29	(FV3000) 生体内分子機構画像解析システム	光学顕微鏡室	3273
H15	(LSM510-META)	光学顕微鏡室	2275
H25	共焦点顕微鏡 (LSM700)	光学顕微鏡室	4606
R2	倒立型リサーチ顕微鏡システム (Dragonfly)	光学顕微鏡室	987
H18	細胞微細胞透過解析システム (JEM-1200A)	電顕室	285
H20	高性能高速冷却遠心機 (Avanti HP-30I)	生化学実験室1	782
R3	高性能高速冷却遠心機 (Avanti JXN-30)	生化学実験室1	62
H21	マルチラベルプレートリーダー (EnSpire)	生化学実験室1	2851
R4	質量分析装置 (0rbitrap)	生化学実験室2	62
R4	DNAシーケンサー (GeneticAnalyzer3500)	生化学実験室2	3854(処理サンプル数)
H29	マイクロフォージ (MF-900)	生化学実験室2	104
H21	リアルタイムPCR (RotorGeneQ HRM)	生化学実験室2	3025
H24	リアルタイムPCR	生化学実験室2	2607
H30	(RotorGeneQ) 茨世代シークエンサー	生化学実験室2	17
R1	(MiSeq system) ケミルミイメージングシステム	生化学実験室2	2828
H21	(FUSION solo S) トータル細胞可視化解析システム	細胞解析室	2501
H19	(FACSCalibur) 先端医療開発のための高度細胞機能解析・評価システム	細胞解析室	5103
1110	(FacsCantoII) フローサイトメーター		0100
H29	(Attune NxT フローサイトメーターアップグレード(R2)を含む) (Attune NxT AF Cytometer Blue/Red Lasers)	細胞解析室	1695
R4	フローサイトメーター (Attune NxT AF Cytometer 1 Lasers) R4年度に4Laser autosamplerにupgrade	細胞解析室	201
R4	フローサイトメーター (Attune NxT AF Cytometer 2 Lasers) R5年度に4Laser autosamplerにupgrade	細胞解析室	307
H17	先端医療開発のための細胞自動解析・評価システム (先端医療開発の為の高度細胞機能解析装置の機能拡張システム(H18)、 セルソーターフルイディクスアップグレード(H27)を含む) (FACSAriaI)(FACSAria UVレーザー(H18)) (FACSAriaI→IIu upgrade(H27))	細胞分取室	1741
H22	セルソーター (附属品(H23)含む)(FACSAriaIII) (FACSAriaIII 405nmレーザー増設(H23))	細胞分取室	1685

○実験動物飼育共同施設

<施設概要>

実験動物飼育共同施設は、昭和49年に滝井キャンパス1号館および3号館の地下に合計550㎡の規模で開設された。平成25年4月の枚方市新町の学舎移転に伴い、学舎北棟の7,8階の実験動物飼育共同施設(約2,000㎡)に移転し、空調設備や研究者の動線確保等、構造的にも近代的な設備となり、本学における医科学研究の進展が大いに期待出来るようになった。実際、近年本学においては、文部科学省の私立大学研究ブランディング事業他、数々の大型研究費に採択されており、さらに令和4年度、本学には光免疫医学研究所が設置され、本施設を利用した動物実験が大きく貢献している。これらの研究を通じて本学発の世界的な研究成果が発信され続けている状況である。

本施設は、教授会により選出された施設長(令和5年現在・大隈 和・微生物学講座教授)の管轄のもと、専任の職員(令和5年現在・高岩郁江)および業務委託スタッフが担当している。飼育ケージの洗浄およびオートクレーブ業務には7名の委託業務員が雇用されている。また、平成25年度より、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「疾患モデル動物センター」(研究代表者:木梨達雄・当時分子遺伝学部門教授)に採択された事により施設がさらに整備され、飼育管理業務一般を請け負う2名の委託業務員を追加雇用し、管理体制が強化されている。

また、平成 27 年より動物実験共同委員会(本施設長、動物実験委員会委員長(令和5年現在・中邨智之・薬理学講座教授)、実験動物管理者(令和5年現在・李 成一・モデル動物部門准教授)により構成)、動物実験管理委員会(令和5年現在 研究担当・木梨副学長及び上記3名を含む他11名)、および利用講座等から推薦を受けた利用代表者からなる実験動物飼育共同施設利用代表者会議における審議を通じて、円滑な施設運営が図られている。

<利用状況>

表1に平成30~令和5年度における、動物別の年間搬入数(サルに関しては 飼育数)を、表2に利用登録研究者数を示す。本施設が開設以来、マウスが飼 育動物の大部分(70~80%)を占め、近年では特に遺伝子改変動物の飼育が増 加している。また、本学の特徴として約11頭のサルが飼育されており、大脳高 次機能(生理学講座)等の研究に寄与している。いずれの実験動物も、収容可 能数の70~80%が飼育されている状態であり、今後なお一層の計画的な運営が 必要となってきている。

表 1. 動物種別搬入数*

	平成 30 年度	平成 31 年度 (令和 元年 度)	令和 2 年 度	令和3年 度	令和 4 年 度	令和5年 度
マウス	4142 匹	4950 匹	4633 匹	4504 匹	4633 匹	4707 匹
ラット	698 匹	606 匹	684 匹	784 匹	736 匹	469 匹
モルモット	27 匹	31 匹	0 匹	13 匹	17 匹	6 匹
スナネズミ	10 匹	0 匹	0 匹	0 匹	0 匹	0 匹
ハムスター	0 匹	0 匹	0 匹	0 匹	0 匹	0 匹
ウサギ	61 羽	41 羽	51 羽	77 羽	30 羽	52 匹
サル	14 頭	12 頭	12 頭	10 頭	11 頭	11 頭

*: 年度末の統計

表 2. 利用登録研究者数*

平成 30 年 度	平成 31 年度(令 和元年 度)	令和 2 年 度	令和3年度	令和4年度	令和5年度
253 名	203名	188名	214 名	198 名	226 名

*: 年度末の統計

◎ 飼育環境の改善

近年、社会的な動物愛護の意識の高まりと共に、実験動物の飼育管理に関する規制が厳しくなってきている。平成17年の「動物の愛護及び管理に関する法律」改正に伴う「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年環境省告示)および「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年文部科学省告示)に従い、施設外での動物飼育の禁止および施設職員による飼育状況のチェックと指導等の取り組みを行っている。

動物実験計画については、毎年、教授会および准講会より選出された動物実験委員会委員による審査を受けることで、実験の適正化を確保するとともに、施設利用者には、毎年、大学院総合講座の一つとして開催される動物実験講習会の受講を義務づけ、この中で動物福祉、倫理、関連法令、実験動物の取り扱いに関する注意事項等の教育を行っている。

倫理的側面においては、本学では昭和49年の実験動物飼育共同施設開設以来、 毎年、学長をはじめ動物実験に携わる研究者全員が参列し、実験動物慰霊祭が 執り行われており、教育および研究のために供された実験動物の需に対する感 謝と弔意の念を示している。

実験動物の飼育については、枚方新施設移転時には全ての SPF マウスについて胚化によるクリーンアップを行うなど適正な飼育環境が実現された。しかし、SPF マウス室において、平成 25 年度に免疫不全マウスにおける緑膿菌感染事例 (緑膿菌は本施設において SPF 検疫対象外)、平成 26 年度、平成 27 年度には消化管原虫による感染事故が 4 回に渡って起こった。これらを重く受け止め、外部からのマウス搬入時における検疫体制を強化するとともに、オートクレーブ可能なソックスカバー、ケージバック、台車の導入などを通じて内部伝播防止対策を進めたが、平成 30 年度にも、肺パスツレラ感染が起こった(薬剤投与、飼育室内の洗浄で終息した)。令和 2 年度後半にも、IVC システムを導入している飼育室で緑膿菌による感染が再度起きた。今後もさらなる感染防止措置に取り組んでいく必要がある。

また、平成27年には遺伝子改変マウスの飼育管理区域外逸走事案が発生し、 文部科学省の立ち入り調査の対象となったことを反省し、利用規約改正による ケージ交換時の手順の徹底、遺伝子改変マウスを使用する実験室における適切 な表示の徹底がなされた。

◎管理・教育体制の強化

現在の実験動物飼育共同施設では、全ての動物飼育区域への入退出がカードキーにより管理され、出入り口のビデオ撮影による監視を行っており、部外者の侵入防止や利用者の適切な使用を促している。

また、飼育区域の整備と感染対策については、現在は同一研究者の異なった 飼育区域間の移動は、原則、禁止されている。また、胚操作室および関連飼育 室、検疫室が整備されたことにより、実験動物の搬入時の微生物コントロール や万一の感染事故への対応が円滑に行われている。

近年の遺伝子解析研究の進展を反映し、本学においても、遺伝子改変動物の 飼育が年々増加しているが、平成 16 年の「遺伝子組換え生物等の使用等の規制 による生物の多様性の確保に関する法律」(いわゆるカルタへナ法)の施行を 受け、全てのマウス飼育室に逃亡防止用のネズミ返しを設置し、さらに遺伝子 改変マウスの出入に関する書類は研究課および実験動物飼育共同施設で管理し ている。

動物の感染事故等の防止、動物の適切な飼育・実験、円滑な施設の利用のためには、利用者の理解と協力が不可欠である。

◎ 今後の展望

平成25年度の学舎移転に伴い、現在の近代的な実験動物共同飼育施設が開設された。これまで、本学の動物実験に関する自己点検・評価(毎年実施)および外部検証(平成28年、令和4年実施証明)を行い、社会的に認められる環境を構築・整備してきた。これからも健全な飼育環境を維持し、本学における医学研究を支援するために、関係教職員および利用者が一致団結して、適切な施設運用を遂行していくことが望まれる。

なお、今後、オートクレーブ 3 台、ロータリーウオッシャー機の更新時期、 オートクレーブ増設工事もあるため、順々に進めていきたい。

○アイソトープ実験施設

<施設概要>

アイソトープ実験施設は、放射性同位元素(以後、RIと略記する)を研究用に使用するために本学に設置された共同利用研究施設である。

当施設の人員は、施設長、副施設長、放射線取扱主任者、特定放射性同位元素防護管理者、専任職員および非常勤職員で構成されている。アイソトープ実験施設はRIに関する法令、予防規程、アイソトープ実験施設運営規則に基づいて放射線業務従事者の管理、放射線同位元素の管理、放射線発生装置の管理を実施しするとともに、放射線を利用した実験の補助や放射線を利用した動物イメージングなどを実施している。

I. RI 実験施設利用

H-3、S-35、I-125 によるラジオイムノアッセイなどのいわゆる in vitro 実験が 蛍光標識体で代替え可能となってからは、新規薬剤の生態分布を放射性同位元素 により検出する研究方法や、CT や SPECT を用いて新規薬剤の生体内分布を画像 化する研究での利用が中心となってきている。

令和 4 年度より Y-90、In-111 などを利用した光免疫療法に関連した標識抗体の 生体内分布の可視化および定量化の実験が開始された。

令和 5 年度には At-211 による α 線放出核種による核医学治療研究も開始し、 At-211 による核医学治療評価、分子イメージングなどが実施されるようになった。

II. 法令

放射性同位元素等に係わる法律(以下、「RI 規制法」という)が改正され、防護セキュリティの強化(令和2年9月11日改正)ならびに測定器の信頼性を確保(令和5年10月1日施行)に伴う法改正に対応をした。

令和 4 年度には令和 3 年 11 月 19 日付けでの原子力規制庁による立入検査についての改善措置を完了させ、原子力規制庁へ報告し受理された。

また令和 5 年度には法的義務となった放射線測定器の計画的な保守点検ならびに校正に関しての放射線障害予防規定を改定し、令和 5 年 10 月 1 日付けにて原子力規制庁へ提出し受理された。

III. 管理体制

令和4年度および令和5年度

施設長	塩島 一朗
副施設長	宇都宮 啓太
副施設長	藤岡 龍哉
選任第一種放射線取扱主任者	米虫 敦
特定放射性同位元素防護管理者	久保 忠昭
健康管理医(産業医)	木村 穣
教務技師	白石 貴博
非常勤職員	井上 まゆみ

<利用状況>

表 1:核種別使用数量*(単位:MBq)

	平成 26	平成 27	平成 28	平成 29	平成 30	令和元	令和 2	令和3	令和4	令和5
	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度**	年度
H-3	36	13	23	0	9	6	11	9	0	0
P-32	57	63	81	37	19	0	23	14	4.5	0
Y-90	27	37	0	0	74	194	0	0	116	25
I-123	0	0	0	0	0	0	464	0	0	0
I-125	11	216	252	104	86	106	149	618	0	119
I-131	0	0	0	0	0	0	760	102	0	0
Ga-67	0	0	0	0	0	0	0	377	37	33
Tc-99m	0	0	0	0	0	0	0	135	1110	105
Tl-201	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20
In-111	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
At-211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13

^{*}小数点以下は四捨五入

**令和6年3月31日現在の統計(統計対象は今年度もしくは昨年度に研究目的での使用履歴のある核種が対象)

表 2: ガンマセル照射時間*(単位:分)

	平成 26	平成 27	平成 28	平成 29	平成 30	令和元	令和 2	令和3	令和4	令和5
	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度**	年度
照射	3318	2448	2704	1187	1245	931	1470	1222	1795	1218
時間										

- *小数点以下は四捨五入
- **令和6年3月31日現在の統計

表 3:利用登録者数

	平成 26	平成 27	平成 28	平成 29	平成 30	令和元	令和 2	令和3	令和4	令和5
	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度	年度**	年度
RI 登録者	91	87	66	48	45	40	47	48	42	40
ガンマセ	90	90	00	40	40	4.4	0.0	1.0	0.1	10
ル登録者	29	29	32	43	49	44	33	18	21	18

^{**}令和6年3月31日現在の統計

表 4:動物実験件数

	平成 29	平成 30	令和元	令和 2	令和3	令和 4	令和5
	年度	年度	年度	年度	年度	年度**	年度
ウサギ	8	6	0	10	54	43	71
ラット	29	74	36	0	26	60	65
マウス	48	0	4	88	45	36	38
総件数	85	80	40	98	125	139	174

^{*}分子イメージングエリアでの動物生体実験の件数

編集後記

新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の世界的な拡大により、研究活動にも多大な影響が及びました。その後、COVID-19の5類感染症への移行に伴いようやく様々な制約が緩和され、学術集会や研究会などにおける直接的な交流が再開し、研究活動が徐々に従来の姿を取り戻しつつあります。

そのような状況の中、本学では2023年4月1日にイタリアのトリノ工科大学との学術交流協定を締結しました。この協定は、バイオメカニクスやバイオサイエンス分野における医工連携の深化を目的としており、両大学が有機的なパートナーシップを構築することで、新たな科学技術の進展が期待されます。また、本協定に基づき、医学と工学の博士号を同時に取得可能なダブルディグリープログラムが設立され、グローバルな視点での研究シーズの育成と独創的な研究課題の立案が進められています。

更に、今後はイタリアのベネチア大学やフェラーラ大学とも協力関係を構築する予定であり、本学に新設された医工学センターとも連携しながら、研究所の発展を図ります。このような国際連携は、新たな発想の創出や研究力向上、国際競争力の強化に大いに寄与するものと期待しています。是非、この機会を活かし、新しい挑戦に踏み出していただければ幸いです。