

関西医科大学
附属生命医学研究所紀要

第 15 号

2 0 2 0

関西医科大学附属生命医学研究所

序

附属生命医学研究所は、2006年に旧肝臓研究所が改組され、分子遺伝学部門、生体情報部門、モデル動物部門でスタートし、次いで、神経機能部門、侵襲反応制御部門が設置されました。平成30年度にゲノム医学研究を促進するため、ゲノム編集部門、ゲノム解析部門が新設されました。また、生理学第一講座が廃止され、細胞機能部門になり、現在の8部門体制に至っています。研究としては免疫・神経・代謝、発生、ゲノム医学の分野を中心として活動し、学内研究のハブとしての機能を担うことが期待されています。具体的には学内研究振興策であるKMUコンソーシアムや研究ブランディング事業にかかわっており、本学の研究の基盤および推進役として重要な役割を担っています。また、研究所共同施設である綜研・アイソトープ、動物施設の管理・運営をサポートしています。各部門は期待に応えるべく、これらのミッションを遂行し、日夜、試行錯誤しながら突破口をめざし、新たな医学知識の発見と応用を目指しています。本年度の成果をご紹介しますので、内外の研究者のご参考になれば幸いです。

研究組織

〔研究部門〕

○分子遺伝学部門

教授 木梨 達雄 (2005.4～)

講師 植田 祥啓 (2008.9～)

講師 上岡 裕治 (2016.4～)

助教 近藤 直幸 (2012.9～)

助教 池田 幸樹 (2018.10～)

○生体情報部門

准教授 松田 達志 (2007.7～)

助教 住吉 麻美 (2016.4～)

○モデル動物部門

准教授 李 成一 (2007.4～)

講師 村山 正承 (2019.5～)

○神経機能部門

研究所教授 小早川 令子 (2015.4～)

准教授 小早川 高 (2016.4～)

○侵襲反応制御部門

学長特命教授 廣田 喜一 (2016.6～)

講師 松尾 禎之 (2016.9～)

○ゲノム解析部門

学長特命教授 日笠 幸一郎 (2018.4～)

講 師 三澤 計治 (2019.2～)

○ゲノム編集部門

学長特命准教授 徳弘 圭造 (2018.4～)

助 教 福田 尚代 (2018.7～)

○細胞機能部門

講 師 小原 圭吾 (2018.4～)

講 師 林 美樹夫 (2018.4～)

講 師 武藤 恵 (2018.4～)

[共同利用研究部門]

○総合研究施設

○実験動物飼育共同施設

○アイソトープ実験施設

○分子遺伝学部門

<研究概要>

T細胞の極性形成における低分子 G タンパク Rap1 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 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 T 細胞特異的 Rap1a および b の二重欠損（Rap1 欠損）マウスから T 細胞を単離してケモカインで刺激し、極性形成を検討した。F-actin と CD44 の集積、分離を、イメージストリームを用いて数学的に定量し、さらに機械学習の導入により、ノンバイアスな判定を行った。その結果、正常型に比べ、Rap1 欠損 T 細胞においては、先端のアクチンおよび後端の CD44 分子の集積、分離が減弱し、細胞の伸長が抑制されることが明らかとなった。極性形成の効率低下に伴い、*in vitro* でのケモカインに対する移動効率および *ex vivo* でのリンパ節実質への浸潤効率が低下していた。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。Rap1 欠損 T 細胞では先端のラメリポディア形成に重要な Rac/CDC42 および PI(3)キナーゼの活性化に顕著な変化が観察されなかった。細胞の後端の伸長には低分子 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。そこで、Rap1 欠損 T 細胞におけるミオシンの活性化を検討したところ、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が低下しており、また、先端のラメラの後方および後端に局在するべきミオシンの重鎖および活性化ミオシン軽鎖の局在が細胞質全体に広がっている細胞が増加していた。RhoA の制御およびミオシンの活性化・局在の破綻が Rap1 の欠損 T 細胞の極性形成異常に関与する可能性があり、現在その機序を解析中である。

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 G タンパク質 Rap1 とその下流因子 Kindlin-3、Talin-1 に制御される接着シグナルはインテグリン活性調節を通じて、リンパ球動態を制御する。リンパ球の血流動態を模した Flow assay 系で用いる接着分子リガンド（ICAM-1、VCAM-1、MAdCAM-1）のコーティング濃度を ^{125}I でのラジオアイソトープ実験によって測定した。これにより、接着分子リガンド間の接着を濃度依存的に定量解析可能になった。T 細胞動態を制御する Rap1 シグナルをより詳細に解析するため、Rap1 の上流に位置する活性化因子 GEF（グアニンヌクレオチド交換因子）の C3G、RasGRP2 それぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスの解析し、C3G、RasGRP2 がそれぞれ機能する時空間的な違いを Flow assay 解析ならびに免疫染色によって確認した。また一方で、Rap1 の不活性化因子にも注目し、RASA3、SIPA1 それぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスの解析を進めた。RASA3、SIPA1 のダブル KO T 細胞においては、ケモカイン刺激なしで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。Rap1 の活性化を可視化するため、「Rap1 センサー」発現 BAF 細胞株を樹立し、綜研内に新しく導入された低毒性 LED 照明装置と高速イメージングカメラを用いて Flow 刺激下での Rap1 活性化をイメージングすることに成功した。これらのデータをまとめ現在、論文投稿準備中である。

LFA-1 リガンド結合依存的 “outside-in” シグナリングによる Rap1 の活性化とそれを介した LFA-1 活性化因子群の一分子動態制御機構の解明

免疫応答に伴い白血球インテグリン LFA-1 は活性化され免疫細胞間の接着を促進する。この過程は極めて瞬時に達成されるが、その制御の時空間的な分子機構は不明であった。

本年度は、インテグリン活性化を担う低分子量 G タンパク質 Rap1 が LFA-1 のリガンド結合に伴う “outside-in” シグナリングにより強く活性化されることを発見した。また、この活性化は LFA-1 に直接結合する活性化因子である Talin1 や Kindlin3 の欠損により減弱化することが明らかになり、Rap1 の強い活性化は Talin1 と Kindlin3 に依存していることが明らかになった。一方、前年度までに確立した Talin1 と Kindlin3 の細胞内一分子動態計測系を駆使し、Rap1 欠損細胞を用いて解析を行ったところ、リガンド結合に伴う Talin1 と Kindlin3 の LFA-1 への結合動態は Rap1 に依存していた。これらのことから Rap1 の活性化と Talin1/Kindlin3 の LFA-1 結合は相互に正の影響を及ぼしあうポジティブフィードバック回路を形成していることが明らかになった。この回路によりインテグリンは流れの速い血中等での即時で強固な接着を可能にしていると考えられる。今後この回路の構成要素の詳細について解析を進める予定である。

インテグリンによる神経膠(芽)腫の増悪化メカニズムの解明

これまでの研究から神経膠芽腫においてインテグリン $\alpha v \beta 3$ 複合体を含む複数のインテグリンの発現の上昇が病態の増悪化に寄与していることを明らかにしている。本病態においてインテグリンを標的にした治療法を確立するためにはこれら複数のインテグリンを同時に制御する必要があると予想される。そこでインテグリンの活性化に共通して重要である因子を阻害することが、当該病態に有効な治療法に繋がると考えた。私たちはインテグリン β 鎖に直接結合して活性化を制御する因子群に対して、その結合を阻害する薬剤の同定を行った。薬剤同定には *in silico* ドッキングシミュレーション法及び、*in vitro* 結合阻害能測定法の 2 つを駆使し、その結果、これまでに 42 種の薬剤候補を同定した。これらの薬剤候補群について検証を進めることで、インテグリン活性化因子を標的とした創薬について推し進めるとともに、インテグリン活性化が及ぼす神経膠(芽)腫の増悪化メカニズムに迫る。

①論文・総説等 (著者名、テーマ名、掲載誌名等、巻・号・頁・発行年)

(原著)

1. Suzuki K., Iwai H., Utsunomiya K., Kono Y., Kobayashi Y., Bui DV., Sawada S., Yun Y., Mitani A., Kondo N., Katano T., Tanigawa N., Takama T., Kanda A., Combination therapy with lenvatinib and radiation significantly inhibits thyroid cancer growth by uptake of tyrosine kinase inhibitor, *Exp Cell Res.* 2020 in press DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112390

(総説)

1. 木梨 達雄【ジーンハンティングによる炎症・免疫研究の発展】IL-4 および IL-5 の遺伝子クローニング 炎症と免疫 26(3)175-180 2020/04
2. Ueda Y., Kondo N, Kinashi T. MST1/2 Balance Immune Activation and Tolerance by Orchestrating Adhesion, Transcription, and Organelle Dynamics in Lymphocytes *Frontiers in immunology* 11:733 2020/05
3. 池田幸樹、木梨達雄 インテグリン創薬から考える一回膜貫通型タンパク質における創薬ストラテジー SAR News 39:17-23 2020/10

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)

(学会発表)

1. K. Baba, Y. Nagashima, R. Takeuchi, M. Sakai, Y. Higashiguchi, H. Katsuno-Kambe, Y. Ueda, Y. Kamioka, T. Kinashi, N. Inagaki, Shootin1b as a clutch molecule for dendritic cell chemotaxis, CELL BIO virtual 2020(Web Meeting), December 14, 20
2. 近藤直幸、植田祥啓、木梨達雄 Rap1/Talin-1/Kindlin-3 を内包する新規ポジティブフィードバック回路によるインテグリン活性化の離散的制御 第43回日本分子生物学会年会、2P-0195、オンライン学会

○生体情報部門

<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の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。

Arf1 経路の阻害剤である brefeldin A は活性化 T 細胞のサイトカイン分泌を抑制することが知られている。実際、公共データベースの解析から、T 細胞では Arf ファミリー分子の中でも Arf1 と Arf6 が高い発現を示すことが分かった。そこで、T 細胞特異的に Cre を発現する Lck-Cre マウスと、Arf1 コンディショナルノックアウトマウスならびに Arf6 コンディショナルノックアウトマウスをそれぞれ交配した。しかし得られたマウスに大きな表現型は認められず、さらに T 細胞特異的な Arf1/6 二重欠損マウス（以下、Arf1/6-TKO）の作出に取り組んだ。得られた Arf1/6-TKO マウスは、胸腺分化に大きな障害は認められず、また末梢 T 細胞を活性化させると正常に増殖・分化すること、さらに驚いたことに、野生型と比肩するレベルの IL-2 や IFN- γ ・IL-17A を分泌することなどが明らかとなった。しかし、詳細な解析を進めた結果、特に腸管において T 細胞数が著しく減少しており、実際、腸管における自己免疫疾患発症のモデルとして知られるナイーブ T 細胞誘導性大腸炎モデルを用いて解析したところ、Arf1/6 二重欠損マウス由来 T 細胞を移入したマウスでは、腸管における活性化 T 細胞数が著しく減少すると共に大腸炎の発症がほぼ完全に抑制されていた。さらに私たちはナイーブ T 細胞誘導性大腸炎モデルと同様に病態発症に Th17 細胞が関与する実験的脳脊髄炎（EAE）の解析に取り組み、同様に Arf1/6-TKO マウスで EAE の発症が抑制されることも見出している。興味深いことに、Arf1/6-TKO マウスをタンパク質抗原である OVA で免疫した際には野生型マウスと同程度の抗体産生の誘導が確認されており、リンパ節における免疫応答と組織における炎症反応とで Arf 経路への依存性が異なるものと推察された（*J. Immunol.*, in press）。以上の観察は、T 細胞特異的に Arf 経路を抑制することで、日和見感染のリスクを上げることなく自己免疫病態を制御できる可能性を示唆しており、今後、他の免疫病についても Arf 欠損の効果を検証する予定である。

B細胞特異的にCreを発現する mb1-Cre と交配してB細胞特異的 Arf 欠損マウスを樹立したところ、T細胞系列特異的欠損マウスとは異なり、Arf1 ならびに Arf6 の単独欠損でそれぞれ異なる表現型が観察された。B細胞特異的 Arf1 欠損（以下、Arf1-BKO）マウスは骨髄におけるB細胞分化の部分的な障害と、それに伴う脾臓B細胞数の減少が認められた一方、腹腔内に存在する B1 B細胞はむしろ増加傾向にあった。他方、B細胞特異的 Arf6 欠損（以下、Arf6-BKO）マウスでは全く趣が異なり、腹腔内 B1 B細胞の割合が著しく低下していたのに対し、骨髄分化や骨髄に由来する脾臓B細胞には目立った変化は認められなかった。さらに定常状態における血中の抗体価を測定したところ、Arf6-BKO マウスでは野生型マウスと同程度の抗体価が検出されたのに対し、Arf1-BKO マウスでは特に IgG サブクラスの抗体価の著しい低下が認められた。そこで、Arf1-BKO マウスにおける抗体価低下の分子機序に焦点を当てて、さらに解析を進めたところ、Arf1-BKO マウスは T細胞依存性抗原である OVA・T細胞非依存性抗原である NP-Ficol1 の何れに対しても抗体産性が全く認められないことが分かった。一方、Arf1-BKO マウス由来の腹腔内 B1 細胞を内在性の B細胞を持たない Rag2-KO マウスに移植したところ、野生型マウス由来 B1 細胞を移植した群と比肩しうるレベルで血中に IgM が検出されたことから、Arf1-BKO マウスでは B2 由来の抗体産生応答が特異的に消失しているものと推定された（未発表データ）。現在、その分子機序の解明に取り組んでいる。

マスト細胞における Arf 経路の機能を検証するため、タモキシフェン誘導性に Arf1・Arf6 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、Arf6 の欠失がマスト細胞分化にほとんど影響を及ぼさなかったのに対し、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（未発表データ）。現在、その分子機構の解明に取り組むと共に、*in vivo* におけるマスト細胞分化への影響を評価すべく、奈良女子大学と共同で開発したマスト細胞特異的 Cre 発現マウスと Arf1 コンディショナルマウスの交配を進めている。

<List of publication>

①論文・総説等

- 1) Mami Sumiyoshi, Yui Kotani, Yuki Ikuta, Kazutomo Suzue, Madoka Ozawa, Tomoya Katakai, Taketo Yamada, Takaya Abe, Kana Bando, Shigeo Koyasu, Yasunori Kanaho, Toshio Watanabe and Satoshi Matsuda. Arf1 and Arf6 Synergistically Maintain Survival of T Cells during Activation. *J. Immunol.* (in press)

○モデル動物部門

<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。例えば、遺伝子を投与・導入した後、刺激を与えた時に、また刺激を与えた部位のみで、遺伝子が発現することは、より効率的で、隣接の非標的細胞への副作用も抑えられると考える。遺伝子発現を開始する DNA 配列シグナルであるプロモーターは、様々な刺激によって活性化される特定の転写因子(例えば NF- κ B)が結合配列に結合し、遺伝子発現を制御すると考えられている。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。

組み換え H 鎖抗体を用いた抗インフルエンザウイルスの感染防御(李成一)

治療用抗体の実用化が進展し、「個の医療」の実現を担う分野として注目されている。しかし、抗体療法の適応疾患は限られており、また HAMA 抗体(Human anti-mouse antibody)の出現、到達性、長い半減期、特異性などが問題となる。このような背景から、通常の IgG 抗体(H 鎖及び L 鎖)より優れている抗原特異性、親和性を持つラクダ科動物の H 鎖のみで構成される VHH 抗体分子の特徴(低分子・抗原特異性・耐熱性など)を生かした、ウイルス感染症の治療研究を意図した。

一方、A 型インフルエンザ感染症は、ヒトを含む哺乳動物や鳥類に広く分布し、最も厄介な人獣共通感染症である。特に、近年のアジアにおける鳥インフルエンザ(H5N1)は抗インフルエンザ薬耐性であったように、抗ウイルス薬についてはその副作用や耐性ウイルスの出現などの問題が報告されている。感染細胞から出芽したばかりのウイルスは膜融合活性を持たないため、まったく

感染性を示さない。宿主の蛋白分解酵素(プロテアーゼ)により赤血球凝集素(Haemagglutinin; HA)の特定部位がHA1とHA2に開裂されると膜融合活性を獲得し、ウイルス遺伝子を細胞質に放出することで、始めて感染が多段階に進行する。しかし、プロテアーゼ阻害による治療は、生体防御、代謝調節など生命維持に不可欠な働きまで抑制する恐れがある。従って、HA蛋白の開裂を特異的に防ぐことにより、感染性を欠如したウイルスのまま、感染の広がりを抑制したほうがより効果的であると考えられる。その複数の抗体を基に遺伝子交雑や変異の導入によってHA抗原の開裂部位に特異的な組換えH鎖抗体を再度選別し、そのHA開裂阻止、感染防御及び治療効果を*in vitro*及び*in vivo*にて解析する。さらに、選別された抗体の抗原結合部位を人工ペプチド化し、その有用性を赤血球凝集阻害試験(HI試験)によって検討する。また、オセルタミビル(商品名;タミフル、NA蛋白の阻害)など既存の抗ウイルス薬との併用による抗ウイルス効果の上昇効果についても解析し、インフルエンザ感染症に対する最適の治療条件を確立する。また、有用性が確認されたH鎖抗体の抗原認識部位のペプチド化により、「ナノ抗体」よりもさらに低分子の治療薬が開発可能となる。感染経路の始終にわたり、「一細胞レベルにおいてのウイルス封じ込め」が感染阻止や予防・治療において最も理想的であると考えられる。

疾患モデルマウスを用いた疾患発症機構の解明(村山 正承)

ヒト疾患の発症機構解明および治療薬の開発において、その疾患症状を模倣するヒト疾患モデルは有用な研究ツールとして広く用いられている。また免疫疾患の制御においては腸内細菌叢が重要な役割を果たすことが知られる。飼育環境毎に腸内細菌叢は異なることから、実験動物施設に適したヒト疾患モデルの誘導条件の確立が重要となる。これまでの研究活動において自己免疫疾患をはじめとしたヒト疾患モデルを用いている(Murayama MA. et al., *Nat Commun.* 2015, *BBRC* 2014 など)。この経験を生かし、本学実験動物施設に適したヒト疾患モデルの構築を試みた。その結果、指定難病である多発性硬化症の疾患モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎、および尋常性乾癬の疾患モデルの導入に成功した。また、学内共同研究活動だけでなく、学外研究機関との共同研究も進行している。私立大学研究ブランディング事業にも参画しており、ヒト疾患モデル動物の作製支援により本学ブランド力の向上に貢献していく。

CTRP3は自己免疫疾患感受性因子として見出した分泌タンパク質であり、関節リウマチの発症を制御することを明らかにしたが(Murayama MA. et al., *BBRC* 2014)、免疫応答におけるCTRP3の作用機序の理解は十分でなかった。CTRP3欠損によりTh17細胞分化が亢進し実験的自己免疫性脳脊髄炎が増悪化することがわかった。機能解析の結果、Th17細胞分化をCTRP3が制御することを見出し現在論文投稿中である(Murayama MA. et al., *in revision*)。

変形性関節症治療薬・治療法の開発に向けた軟骨細胞増殖制御機構の解明(村山 正承)

変形性関節症は機械的刺激などによる軟骨組織の変性が特徴的な退行性の骨疾患であり、健康寿命を脅かす。高齢化社会・生活習慣病が深刻化する日本では症状のある患者が約1,000万人、潜在的な患者は3,000万人と推定され早急に解決すべき医療課題である。再生医療技術は変形性関節症の治療方策を大きく転換させる医療として期待されるが、軟骨細胞の効率的な調整が課題となっている。

AdipokineであるCTRPファミリー分子は代謝内分泌にて類似した機能を持つ。また、いくつか

の CTRP 分子は共通のレセプターを介して機能することが知られる。CTRP3 は軟骨細胞の増殖を制御することが報告されたが、その機能を介する受容体が明らかでなかった。しかし、分子生物学的手法を用いた解析により、CTRP3 の受容体は AdipoR2 であることを世界に先駆けて同定すると共に、CTRP3-AdipoR2 が軟骨細胞の増殖を制御することを明らかにした (Murayama MA. et al., *Translat Regulat Sci.* 2020)。本発見に関する特許は申請済みである。

「List of Publication」

原著論文

1. **Murayama MA***, Iwakura Y. C1q/TNF-related protein 3 regulates chondrogenic cell proliferation via adiponectin receptor 2 (progestin and adipoQ receptor 2). *Translat Regulat Sci.* 2020 Apr;2(1):19-23. *:Corresponding author.
2. Yabe R, Chung SH, **Murayama MA**, Kubo S, Shimizu K, Akahori Y, Maruhashi T, Seno A, Kaifu T, Saijo S, Iwakura Y. TARM1 is involved in the development of arthritis by activating dendritic cells through recognition of collagens. *Nat Commun.* Accepted.

総論

1. **Murayama MA***. The relationship between cognitive functions and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *BIO Clinica.* 2020 Apr 10;35(4):377-379. Japanese. Invited. *:Corresponding author.
2. **Murayama MA***. The development of Alzheimer's disease models. *BIO Clinica.* 2020 Sep 10;35(10):975-977. Japanese. Invited. *:Corresponding author.

学会発表

1. **村山正承**, 紀熙華, 岩倉洋一郎. 変形性関節症における CTRP6 の役割の解析. 第 67 回日本実験動物学会総会. 大阪府. 2020 年 5 月 23-25 日. ポスター発表. 新型コロナウイルス (COVID-19) の感染拡大により誌上開催に変更.
2. 植田祥啓, 池田幸樹, 岩田亮一, 赤間智也, 三木貴雄, 住吉麻実, **村山正承**, 山崎文和, 平野伸二, 上岡裕治, 近藤直幸, 福原貴太郎. がん微小環境の接着制御機構の解明と接着チェックポイント阻害剤の開発. 第 4 回関西医科大学学術祭. 大阪府. 2020 年 11 月 7 日. 口頭発表.
3. **村山正承**, 徳裕圭造, 福田尚代, 上岡裕治, 植田祥啓, 岩井大, 神田晃, 岩田亮一, 林美樹夫. 免疫システム完全ヒト化モデル動物の開発および応用を目指した基礎研究. 第 4 回関西医科大学学術祭. 大阪府. 2020 年 11 月 7 日. 口頭発表.

学会発表

1. 岩倉洋一郎, **村山正承**. 軟骨細胞増殖促進剤、軟骨細胞増殖促進方法、及び軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法. 出願番号: 特願 2018-024297.

○神経機能部門

<研究概要>

神経機能部門では、自ら開発した、マウスに対して強力な先天性恐怖情動を誘発する匂い分子であるチアゾリン類恐怖臭(Thiazoline-related fear odors: tFOs)がこれまでに知られていない「人工冬眠・生命保護作用」を誘導することを解明した(Matsuo et al., *Com Biol.*, in press)。さらに、この生命保護状態は三叉神経や迷走神経に存在する TRPA1 を介して脳幹から中脳へ至る生命保護中枢へ情報が伝達されることで誘導できることを解明した(Matsuo et al., *Nature Commun.*, in press)。これら研究により、感覚神経の TRPA1 を適切な種類の tFO で活性化し脳へ情報を伝達することで潜在的な生命保護能力を誘導する「感覚創薬」の概念が提唱された。

ヒトや動物は進化の過程で危機状態での生存確率を上昇させる潜在的な能力を獲得したが、その全貌は良く分かっていない。先天性恐怖情動は危機状態を感知した脳により誘導され、生存確率を上昇させる行動や生理応答を統合的に誘導する脳の機能であると考えられる。従って、先天性恐怖情動を制御する脳のシステムは潜在的な生命保護能力の誘導システムと密接に関与している可能性が考えられる。しかし、これまでは恐怖情動はストレスとして心身に悪影響を及ぼすと認識されており、先天性恐怖情動と潜在的な生命保護作用の関連を明らかにする研究は殆ど行われてこなかった。

私たちは先天性と後天的な恐怖情報が恐怖中枢である扁桃体中心核において拮抗的に制御されることを解明した(Isosaka et al., *Cell* 2015)。このことは、先天性と後天的な恐怖の間には逆方向へ向く性質が存在する可能性を示す。実際に、先天性と後天的な恐怖刺激を与えたマウスにおいては、体温や代謝が前者では低下するが後者では増加することが明らかになった。これまで、先天性と後天的な恐怖は同様の情動状態であると考えられてきたが、両者は拮抗的な異なる種類の情動状態と捉えるべきであることが示唆される。

これまでの恐怖情動の研究においては後天的な恐怖が主に研究対象とされてきた。これに対して、先天性恐怖情動の研究は遅れていた。その原因として、先天性恐怖情動をモデル動物やヒトに対して効率的に誘導する実験系が確立されていなかったことが挙げられる。私たちは、匂い分子に対する情動行動を先天性と後天的に誘導する神経回路が分離して存在することを解明したが(Kobayakawa et al., *Nature* 2007)、この原理に基づいて、人工匂い分子ライブラリーの中から極めて強力な先天性恐怖情動行動を誘導する tFOs を開発した。さらに、大規模なフォワードジェネティクススクリーニングにより tFO に対する恐怖行動を誘導する受容体遺伝子が *Trpa1* であることを解明した(Wang et al., *Nature Commun* 2018)。これらの一連の研究により、極めて強力な先天性恐怖情動をモデル動物に誘導する新たな実験系が確立された。

そこで私たちは、tFOを用いて誘導する強力な先天的恐怖情動が未知の潜在的生命保護能力の誘導活性を持つ可能性を検証する研究を実施した。tFO刺激を長時間与えるとマウスの体温は室温近くにまで低下し、続いて、tFO刺激を中止すると体温が回復し、正常な行動を回復した。即ち、tFO刺激はマウスに安全な人工冬眠状態を誘導できる。これまでに、低濃度の硫化水素刺激によりマウスの人工冬眠状態が誘導できることは報告されていた。低濃度の硫化水素はミトコンドリアの呼吸鎖を適度に抑制することで、低代謝・低体温を誘導すると考えられる。これに対して、tFOはミトコンドリアの阻害活性を持たず、感覚刺激として脳が誘導する内在的な低体温状態を誘導するという点が大きく異なる。

冬眠は餌のない冬季をエネルギー消費量を抑制することで乗り切る生存戦略の一つであり、自然界では特定の種類の動物が実施する能力を持つ。冬眠状態では呼吸や代謝が抑制された状態で生存するために低酸素状態に対する耐性が誘導される。このために、冬眠動物は脳梗塞や心筋梗塞などを含む虚血再灌流障害に対する抵抗性を持つ。非冬眠動物であるヒトの体温、とりわけ脳の温度を人為的に低下させる低体温療法は脳への血流低下による神経細胞の不可逆的な破壊を抑制する効果を持つ。tFO刺激も皮膚と脳の虚血再灌流障害に対する治療効果を発揮することが判明した。さらに、tFO刺激を予め与えておいたマウスでは通常のマウスが15分程度しか生存できない低酸素環境でも、数時間以上も生存することが可能になった。脳への血流が低下する緊急患者や、組織への血流を停止せざるを得ない外科手術中の患者などに対して、tFO刺激を与えることで低酸素抵抗性を誘導するという医療応用の可能性が示された。

tFOが誘導する低体温・低代謝状態と冬眠状態は共に体温や代謝が低下するという点は同等である。しかし、tFO刺激は脳へのグルコースの取り込みを加速することや、血液中の酸素飽和度を低下させるなどの、冬眠状態とは逆方向の応答を誘導した。さらに、冬眠状態やこれを模した低体温療法では免疫機能が抑制され、感染に対する抵抗性が低下するという副作用が誘導される。これに対して、tFO刺激では強力な抗炎症作用が誘導されると同時に、血液中の自然免疫を担う細胞の数が増加するという「抗炎症性免疫増強作用」が誘導されることが明らかになった(Matsuo et al., *bioRxiv*, 2020)。これらの結果などから、冬眠状態はエネルギー消費を抑制することが主目的の生理応答であり、その結果、抵抗性は抑制されるのに対して、tFO誘導性の人工冬眠・生命保護状態では、むしろ積極的にエネルギーを利用して潜在的な生命保護能力を誘導することを主目的とする生理応答であり、低体温・低代謝応答が誘導される目的が両者の間で異なることが示唆された。

List of Publication

原著論文

1. Matsuo T, Isosaka T, Hayashi Y, Tang L, Doi A, Hayashi H, Lee CY, Cao L, Kutsuna N, Matsunaga S, Matsuda T, Yao I, Setou M, Kanagawa D, Higasa K, Ikawa M, Liu Q, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Thiazoline-related TRPA1 agonist odorants orchestrate survival fate in mice. *bioRxiv* 10.1101/2020.05.17.100933 (2020)
2. Matsuo T, Isosaka T, Tang LJ, Soga T, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related innate fear odors. *Comm Biol.* in press
3. Matsuo T, Isosaka T, Hayashi Y, Tang LJ, Doi A, Yasuda A, Hayashi M, Lee CY, Cao L, Kutsuna N, Matsunaga S, Matsuda T, Yao I, Setou M, Kanagawa D, Higasa K, Ikawa M, Liu Q, Kobayakawa R, Kobayakawa K. Thiazoline-related innate fear stimuli orchestrate hypothermia and anti-hypoxia via sensory TRPA1 activation. *Nat Comm.* in press

口頭発表（学会・シンポジウム・セミナー）

1. 小早川 令子、小早川 高、松尾 朋彦、伊早坂 智子
「先天的恐怖を誘発する匂い物質による生体保護作用」
第43回日本神経科学大会、2020年7月29日～8月1日、WEB開催
2. 小早川 高
「Crisis fate orchestration: 先天的恐怖情動誘導性の生命保護作用」
情動研究会 2020、2020年9月16日、WEB開催
3. 小早川 令子
「人工冬眠・生命保護作用を誘導する匂い分子の発見とその作動機序」
第4回 感覚研究フロンティアシンポジウム、2020年10月31日、WEB開催
4. Kobayakawa K “Artificial hibernation-like state with intrinsic life-protective abilities induced by innate fear-eliciting odorant molecules” 富山大学大学院特別セミナー、2020年12月7日
5. Matsuo T “Orchestrated induction of bioprotective effects by innate fear odors in mice”
8th Symposium of the Smart-Aging Research Center, Tohoku University, 2020 Dec.10th

著書

1. 小早川 高「天敵の匂いと生体反応」
「Clinical neuroscience」32巻2号（中外医学社）、2021年1月31日発行

○侵襲反応制御部門

<研究概要>

本部門では、酸素代謝が生体の機能維持にいかなる役割を果たしているかを疾患の病態生理学との関連で追及することを研究目標として掲げている。

酸素はヒトの生存に必須の分子である。酸素はエネルギー産生における役割が強調されるが、生体内のシグナル伝達に重要な役割を果たしている分子でもある。酸素から生成される活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) は生体への毒性を発揮する場合もあるが細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして必須の役割を果たしている。このような酸素の生体における多様な役割の解明に学長特命教授 1 名、講師 1 名、大学院生 (他科目履修) 1 名、研究員 3 名に研究医養成コース学生 2 名、加えて、産科学・婦人科学講座、整形外科学講座、外科学講座、救急医学講座、眼科学講座との共同研究を推進している。

本年度 COVID-19 の流行により活動に大きな制限を受けた。

特に対外的な活動は大きく制限され学会などの活動も遠隔参加を余儀なくされた。

以下に今年度の研究成果について記述する。

I. 生体の低酸素応答・ROS 応答の生物学

1. マクロファージ活性化における代謝リプログラミングの分子機序

炎症応答において免疫細胞のエネルギー代謝様式の転換 (リプログラミング) が起こることが報告され、炎症の制御メカニズムとして細胞内代謝調節の重要性に注目が集まっている。本年度は自然免疫細胞の活性化に伴う代謝変容の分子機構を明らかにするため、遺伝子発現プロファイルの変化および代謝フラックスの観点から解析を行った。LPS/IFN- γ の投与によりマクロファージ様細胞株に代謝リプログラミングを誘導し、RNA-Seq 解析にて炎症応答およびエネルギー代謝様式のシフトに伴う遺伝子プロファイルの変動に関するデータセットを得た。炎症経路の活性化に加え、炎症性マクロファージの分化マーカーの誘導、増殖・生存制御に関わる細胞内経路の変容が観察された。また代謝リプログラミングによる酸素消費量の低下および解糖活性の上昇について、リアルタイムフラックス解析により経時的な代謝変動のモニタリングを行った。炎症刺激直後に解糖活性の上昇が起こり、その後約 3 時間にわたって維持された。刺激後約 3 時間後から酸素消費量が徐々に低下する現象が確認されたが、それに伴い解糖活性の速やかな再活性化が誘導されることが明らかとなった。

2. ポリサルファイド (H_2S) が細胞機能に与える影響の探究

硫化水素 (H_2S) は、神経伝達調節、血管弛緩、酸化ストレスからの細胞保護、抗炎症など

様々な作用を持つシグナル分子として機能している。しかし、その作用メカニズムの詳細は未だ解明されていなかった。新規シグナル分子として最近注目を集めているポリサルファイド (H_2Sn) が生体内で H_2S から酸化反応により生成されることが示され H_2S の作用の一部を担っているという報告も存在する。本研究室では従来の H_2S を用いた研究を発展させ H_2Sn の低酸素誘導性遺伝子発現に対する作用について検討してきた。 H_2Sn がミトコンドリアを標的として生体内の低酸素感知機構を攪乱することにより低酸素誘導性の転写因子 HIF の活性化を阻害することを見いだして論文にとりまとめ投稿した。

3. 喫煙による子宮内膜での低酸素誘導性因子の活性化の探究

喫煙 (CS) は、癌を含む多くの致死性障害の発生に寄与する主要な要因である。また、喫煙や受動喫煙は妊娠の成立や維持にも影響を及ぼすが、ヒトの子宮内膜に及ぼす喫煙の影響については、いまだ十分に理解されていない。私たちはヒト初代子宮内膜間質細胞と不死化細胞株 (KC02-44D) を用いて、CS 誘導性低酸素誘導因子 (HIF) -1 α 活性化の制御機構を検討した。その結果、CS 抽出物 (CSE) は子宮内膜間質細胞において活性酸素種レベルを上昇させ、HIF-1 α タンパク質の安定化を促進すること、また、低酸素環境下では濃度および時間に依存して HIF-1 α 依存性の遺伝子発現を誘導することを明らかにした。さらに、低酸素環境下でも、CSE 処理後に低酸素誘導遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。これらの結果から、HIF-1 α は CSE による細胞ストレス、炎症、子宮内膜リモデリングに重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この研究結果は論文に取りまとめて投稿して現在リバイズ中である。

II. バクテリアメタゲノム

1. 超小型ナノポアシーケンサーを用いたオンサイト迅速微生物同定技術の開発：感染症診断と常在微生物叢解析への応用

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という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ケンサー MinION を用いて、その最大の利点であるロングリードシーケンシング技術を活用し精度の高い細菌同定法の確立に成功した。細菌 16S rRNA 遺伝子の全長配列を解読することにより、従来困難であった種レベルの判別が可能となった。腸内細菌叢解析においては、従来のショートリード型シーケンサーによる大規模解析と比較して、より短時間で高解像度な細菌プロファイリングが可能であることを示した (論文投稿中)。さらに他の診療課との共同研究により、感染症の迅速診断のほか、産科・婦人科領域における膣内細菌叢解析など微生物叢と宿主の生理・病態との関連解析を進めている。

List of Publication

① 論文・総説

- [1] S. Boku, M. Watanabe, M. Sukeno, T. Yaoi, K. Hirota, M. Iizuka-Ohashi, K. Itoh, T. Sakai, Deactivation of Glutaminolysis Sensitizes PIK3CA-Mutated Colorectal Cancer Cells to Aspirin-Induced Growth Inhibition, *Cancers (Basel)* 12 (2020). 10.3390/cancers12051097.
- [2] H. Bono, K. Hirota, Meta-Analysis of Hypoxic Transcriptomes from Public Databases, *Biomedicines* 8 (2020) E10. 10.3390/biomedicines8010010.
- [3] K. Hirota, Basic Biology of Hypoxic Responses Mediated by the Transcription Factor HIFs and its Implication for Medicine, *Biomedicines* 8 (2020) E32. 10.3390/biomedicines8020032.
- [4] Y. Fujii, K. Hirota, Critical Care Demand and Intensive Care Supply for Patients in Japan with COVID-19 at the Time of the State of Emergency Declaration in April 2020: A Descriptive Analysis, *Medicina (Kaunas)* 56 (2020). 10.3390/medicina56100530.
- [5] S. Komiya, Y. Naito, H. Okada, Y. Matsuo, K. Hirota, T. Takagi, K. Mizushima, R. Inoue, A. Abe, Y. Morimoto, Characterizing the gut microbiota in females with infertility and preliminary results of a water soluble dietary fiber intervention study, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 67 (2020) 105–111. 10.3164/jcbrn.20 53.
- [6] K. Kojima, A.T. Nishida, K. Tashiro, K. Hirota, T. Nishio, M. Murata, N. Kato, S. Kawaguchi, A. Zine, J. Ito, T.R. Van De Water, Isolation and Characterization of Mammalian Otic Progenitor Cells that Can Differentiate into Both Sensory Epithelial and Neuronal Cell Lineages, *Anat Rec (Hoboken)* (2020). 10.1002/ar.24335.
- [7] M. Kakita-Kobayashi, H. Murata, A. Nishigaki, Y. Hashimoto, S. Komiya, H. Tsubokura, T. Kido, N. Kida, T. Tsuzuki-Nakao, Y. Matsuo, H. Bono, K. Hirota, H. Okada, Thyroid Hormone Facilitates in vitro Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells via Thyroid Hormone Receptors, *Endocrinology* 161 (2020). 10.1210/endo/bqaa049.
- [8] Y. Matsuo, S. Komiya, Y. Yasumizu, Y. Yasuoka, K. Mizushima, T. Takagi, K. Kryukov, A. Fukuda, Y. Morimoto, Y. Naito, H. Okada, H. Bono, S. Nakagawa, K. Hirota, Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution, *bioRxiv* (2020). DOI: 10.1101/2020.05.06.078147.
- [9] Y. Fujii, Y. Mori, K. Kambara, K. Hirota, M. Yanada, S. Toda, M. Hashiguchi, Pulmonary vein thrombosis and cerebral infarction after video-assisted thoracic surgery of the left upper lobe: a case series, *JA Clin Rep* 6 (2020) 71. 10.1186/s40981-020-00378-9.
- [10] 松川 志乃, 広田 喜一, 周術期炎症マーカー：現状と課題, 今後の展望 炎症応答の一步先へ, *Life Support and Anesthesia* 27 (2020) 852-857.
- [11] 広田 喜一, 藤井 庸祐, ARS-CoV-2 感染と過剰炎症応答・サイトカインストーム 勝敗の帰趨を決めるものは何か?, *Life Support and Anesthesia* 27 (2020) 858-862.

[12] 広田 喜一, 村田 宮彦, 新宮 興, 1.39 から 1.58 へ—動脈血酸素含量の新計算式を提案します, *Life Support and Anesthesia* 27 (2020) 1125-1127.

[13] 広田 喜一, ミトコンドリアの酸素代謝異常と疾患, *医学のあゆみ* 274 (2020) 248-252.

[14] 広田 喜一, 局所麻酔薬／プロポフォールとミトコンドリア障害：HIF-1 活性化による障害軽減の可能性, *Anet* 24 (2020) 15-19.

② 学会発表

第 93 回日本生化学会大会

Web 開催

2S08e 9月15日(火) 17:00-19:00

シンポジウム

古くて新しいイオウとセレンの生化学:その多様な生理機能

ポリサルファイド (H_2Sn) が細胞機能に与える影響の探究 - Exploring the effects of polysulfide (H_2Sn) on cell function

講演

■ICNIM オンライン特別講演会

日時： 2020年10月1日(木) 15:30~17:00

講師： 広田 喜一

演題： 「低酸素生物学から酸素・代謝生物学：免疫調節への関与」

■第14回日本腎臓病薬物療法学会学術集会・総会

Web セミナー6

日時： 2020年12月20日(日) 14:00~15:00

講師： 広田 喜一

演題： 「ノーベル医学・生理学賞「低酸素応答」の医学的意義」

○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

本課題では、家族集積性の強い希少難治性疾患を対象に次世代シーケンサーを用いたゲノムシーケンス解析を実施し、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。主な対象疾患は以下の通りである。

(Galloway-Mowat 症候群、IgA 腎症、アルポート症候群、ゴーシェ病、リンパ脈筋腫症、間質性腎炎、巣状糸球体硬化症、多発性嚢胞腎、肺動脈性肺高血圧症、肺静脈閉塞症、肺線維症、肺動脈狭窄症、肥大型心筋症、滲出性硝子体網膜症、錐体杆体ジストロフィー、遅視症、網膜色素変性症、アッシュャー症候群、強度近視、加齢黄斑変性症、ミオクロームスτένかん、二分脊椎症、痙性対麻痺、もやもや病、筋ジストロフィー)

II. 複雑系疾病のオミックス解析

多因子性疾患に代表される様々な複雑系疾病は、遺伝因子だけでなく環境因子や生活習慣などの複数要因の相互作用により、発症や重症化に至る。本課題では、IgG4 関連疾患、HTLV-1 関連疾患、肺高血圧症、IgA 腎症、高尿酸血症などの複雑系疾病を対象にオミックスデータの収集をおこない、蓄積された情報を統合的に解析する方法論の開発や、多角的な関連解析モデルの構築による病態の解明研究を推進している。

- 高尿酸血症は、我が国の 30 歳以上の男性の約 3 割を占め、痛風、慢性腎臓病、心臓病などの発症リスクを高めることが知られている。尿酸値に影響を与えている因子として尿酸トランスポーターURAT1 遺伝子の遺伝的多様性に着目し、ヒトの尿酸値の変動に関与することを見出した。これらの結果に加え、日本人の全ゲノム配列や付随するオミックスデータを活用することで遺伝的因子や食生活等の環境要因を包含する高精度の疾患発症リスク推定モデルを構築する研究を進めている。

<プレスリリース>

2020.3.30 【関西医科大学】尿酸値を左右する新たな遺伝的要因を発見

http://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000b581-att/20200330KMUPress_Release.pdf

- IgG4 関連疾患の国際診断基準を満たす患者 857 例の DNA を用いて全ゲノム関連解析を行い、HLA-DRB1 遺伝子と FCGR2B 遺伝子に本疾患と有意な関連を見出した。HLA-DRB1 タンパク質の抗原を提示する Gβドメインの 7 番目のアミノ酸

が発症しやすさに関連すること、さらに、FCGR2B 遺伝子の変異は炎症で腫れの出る臓器の数や診断時の血中の IgG4 の濃度と関連することも示された。本研究結果は、IgG4-RD の高リスク群の予測や診断だけでなく治療法や薬の開発に役立つことが期待される。

<プレスリリース>

2019.9.11【京都大学】指定難病 IgG4 関連疾患と HLA-DRB1、FCGR2B 遺伝子との関連を解明 – 疾患の感受性遺伝子を網羅的に探索 –

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2019/190806_3.html

日本経済新聞（9月16日 9面）に掲載

III. 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350万件、データダウンロード数6,900件と、国内外から幅広い支持を得ている。主な公開情報は以下の通りである。

- 1,208名のエクソームシーケンス解析による288,025座位の日本人のエクソン領域における遺伝子型頻度情報
- 3,248名の一塩基多型（SNP）タイピングによる1,794,196座位の日本人のゲノム多型頻度情報
- 300名の発現アレイ解析とエクソームシーケンス情報を組み合わせた21,755遺伝子における網羅的発現関連解析（eQTL）情報

現在、本データベースを拡張するために、日本人約24万人のSNPタイピング情報をもとに集団遺伝学的解析を実施し日本人集団の遺伝的背景を網羅する3,000人の全ゲノムシーケンス解析を実施している。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においては必須の情報源となることが期待される。

IV. 臨床ゲノム情報統合データベース（希少難病・感染症）の構築

日本医療研究開発機構（AMED）が主導する「臨床ゲノム情報統合データベース整備事業」において、希少・難病分野及び感染症分野のデータベース整備に携わっている。

- 希少難病分野においては、各拠点で収集される希少難病の臨床情報並びにWGS/WES/ターゲット遺伝子シーケンス解析をもとに蓄積される各疾患の確定

遺伝子変異とその頻度情報の集約・共有のために構築したデータベースを利用して、435疾患2,037症例で同定された計2,311変異の登録を完了し、今後の遺伝子診断において重要な情報基盤の構築を進めている。

- 感染症分野「HTLV-1関連疾患」においては、現在までにHAM/TSP症例、ATL症例、キャリア、感染地域住民（非感染者）など計7,605検体の臨床情報と検体を収集した。疾患および地域で階層化した延べ6,423人からなるHLA頻度情報、および、4,678人からなる一塩基多型（SNP）のジェノタイプ頻度情報をデータベース化し、HAM/TSP患者とキャリア間のゲノムワイド関連解析、次世代シーケンサーを用いたプロウイルス組込み部位とウイルスゲノム配列解析を進めている。

V. 難病プラットフォームの設計と構築

難病プラットフォームは、日本医療研究開発機構（AMED）の「難治性疾患実用化研究事業」および厚生労働省が所管する「難治性疾患政策研究事業」で行われている難病を対象としたレジストリ研究を推進する事業である。本事業を通して集約される様々な難病のデータを対象に難病の解明や診断に役立つ情報を抽出するために、人工知能を活用した研究開発を進めている。

VI. がんゲノム解析

昨年度、本学は厚労省指定の「がんゲノム医療」連携病院として登録された。今後、中核病院を目指し存在感を高めていくために、運用体制の整備だけでなく、診断実績および研究成果の蓄積を支援する活動を行っている。

VII. 日本人ヒトゲノム多様性の地域差の研究

佐渡島は新潟県にあるにもかかわらず、佐渡方言は西日本方言に近い。佐渡島住民の遺伝的背景を調査するため、佐渡島、西日本（滋賀）、東日本（宮城）のヒト集団についてゲノム解析を行ったところ、佐渡島住民の遺伝的距離は西日本と東日本のどちらに近いとも言えず、むしろ相対的に西日本と東日本が近いことが示された。佐渡島は本州とは海で隔てられているため、佐渡島内特有の遺伝的浮動が生じたものと考えられる。また、方言と遺伝的距離の不一致は、言語とゲノムの進化速度が異なることを示唆している。

VIII. ゲノムワイド関連解析手法の開発

従来のゲノムワイド関連解析は、ゲノム上に存在する2種類のアレルを仮定しているが、昨今のゲノム解析検体数の増加に伴い、3種類以上のアレルが検出される領域も増加傾向にあることから、アレルが多数存在する場合にも対応可能な解析手法を開発している。

英文原著

1. Okada D, Nakamura N, Setoh K, Kawaguchi T, **Higasa K**, Tabara Y, Matsuda F, Yamada R. Genome-wide association study of individual differences of human lymphocyte profiles using large-scale cytometry data. *J Hum Genet.* 2020, doi: 0.1038/s10038-020-00874-x
2. Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, Muramatsu H, Okuno Y, **Higasa K**, Shimada M, Takeshima H, Hanada K, Hirano T, Kawakita T, Sakaguchi H, Ichimura T, Ozono S, Yuge K, Watanabe Y, Kotani Y, Yamane M, Kasugai Y, Tanaka M, Suganami T, Nakada S, Mitsutake N; Hara Y, Kato K, Mizuno S, Miyake N, Kawai Y, Tokunaga K, Nagasaki M, Kito S, Isoyama K, Onodera M, Kaneko H, Matsumoto N, Matsuda F, Matsuo K, Takahashi Y, Mashimo T, Kojima S, Ogi T. Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. *Adv Sci.* 2020, 6(51):eabd7197
3. Numa S, Oishi A, **Higasa K**, Oishi M, Miyata M, Hasegawa T, Ikeda HO, Otsuka Y, Matsuda F, Tsujikawa A. EYS is a major gene involved in retinitis pigmentosa in Japan: genetic landscapes revealed by stepwise genetic screening. *Sci Rep.* 2020 Nov 27;10(1):20770
4. Koyama S, Ito K, Terao C, Akiyama M, Horikoshi M, Momozawa Y, Matsunaga H, Ieki H, Ozaki K, Onouchi Y, Takahashi A, Nomura S, Morita H, Akazawa H, Kim C, Seo JS, **Higasa K**, Iwasaki M, Yamaji T, Sawada N, Tsugane S, Koyama T, Ikezaki H, Takashima N, Tanaka K, Arisawa K, Kuriki K, Naito M, Wakai K, Suna S, Sakata Y, Sato H, Hori M, Sakata Y, Matsuda K, Murakami Y, Aburatani H, Kubo M, Matsuda F, Kamatani Y, Komuro I. Population-specific and trans-ancestry genome-wide analyses identify distinct and shared genetic risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 52(11):1169-1177, 2020.
5. Nakamura R, **Misawa K**, Tohnai G, Nakatochi M, Furuhashi S, Atsuta N, Hayashi N, Yokoi D, Watanabe H, Watanabe H, Katsuno M, Izumi Y, Kanai K, Hattori N, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Shibuya K, Kuwabara S, Suzuki N, Aoki M, Ohta Y, Yamashita T, Abe K, Hashimoto R, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Okada Y, Ishihara T, Onodera O, Nakashima K, Kaji R, Kamatani Y, Ikegawa S, Momozawa Y, Kubo M, Ishida N, Minegishi N, Nagasaki M, Sobue G. A multi-ethnic meta-analysis identifies novel genes, including ACSL5, associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Commun Biol* 23;3(1):526, 2020

6. Gervais O, Ueno K, Kawai Y, Hitomi Y, **Misawa K**, Teraguchi S, Wang YY, Tokunaga K, Nagasaki M. iGenomic Heritabilities and Correlations of 17 Traits Related to Obesity and Associated Conditions in the Japanese Population. *G3 (Bethesda)* 7;10(7):2221-2228, 2020.
7. **Misawa K**, Hasegawa T, Mishima E, Jutabha P, Ouchi M, Kojima K, Kawai Y, Matsuo M, Anzai N, Nagasaki M. Contribution of Rare Variants of the SLC22A12 Gene to the Missing Heritability of Serum Urate Levels. *Genetics* 214(4);1079-1090, 2020.
8. Nagata M, Setoh K, Takahashi M, **Higasa K**, Kawaguchi T, Kawasaki H, Wada T, Watanabe A, Sawai H, Tabara Y, Yamada T, Matsuda F, Kosugi S. Association of ALPL variants with serum alkaline phosphatase and bone traits in the general Japanese population: The Nagahama Study. *J Hum Genet.* 65(3):337-343, 2020.
9. Anderson-Trocmé L, Farouni R, Bourgey M, Kamatani Y, **Higasa K**, Seo JS, Kim C, Matsuda F, Gravel S. Legacy Data Confounds Genomics Studies. *Mol Biol Evol.* 37 (1), 2-10, 2020.

学会発表

1. **三澤 計治**、長谷川 嵩矩、三島 英換、Promsuk Jutabha、大内 基司、小島 要、河合 洋介、松尾 雅文、安西 尚彦、長崎 正朗 尿酸値の失われた遺伝率は、レアバリエントがかなりの部分を説明する 2020年日本バイオインフォマティクス学会 2020年9月2日
2. Miyawaki N, Toyota T, Kim K, Kitai T, Kaji S, **Higasa K**, Nakamura T, Furukawa Y. Novel double missense mutation at the same codon in the MYH7 gene in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. European Society of Cardiology Congress 2020.08.29
3. 佐藤 芳憲、塚口 裕康、吉村 吾志夫、**日笠 幸一郎**、川田 尚人、乾 聖子、井上 嘉彦、小岩 文彦 IgA腎症における家族集積性は腎不全進行のリスク因子となる 第63回日本腎臓学会 2020年8月20日
4. **三澤 計治**、長谷川 嵩矩、三島 英換、Promsuk Jutabha、大内 基司、小島 要、河合 洋介、松尾 雅文、安西 尚彦、長崎 正朗 尿酸値の失われた遺伝率は、レアバリエントがかなりの部分を説明する 第53回日本痛風・尿酸学会 2020年2月13日

○ゲノム編集部門

<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 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 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。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-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。次に t-flippase は genomic DNA の coding region を含む領域が 103Kb と非常に長いため、exon2 にストップコドン挿入した欠損マウスを 1 系統樹立した。このマウスも t-scramblase 欠損マウスと同様に、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。

しかしながら、t-flippase 欠損マウスに関しては発現している mRNA 配列を確認したところ、stop codon の挿入されている exon2 をスキップした mRNA が発現していることが分かった。この mRNA から発現するタンパク質は全長 1183 アミノ酸の内の 25 アミノ酸のみが欠損したタンパク質が発現する可能性が明らかとなった。そのため、膜貫通ドメインの存在する C 末端領域を 10Kb ほど deletion する、新たな欠損マウスの作製を試みた。guide RNA を 2 本使用して受精卵にエレクトロポレーションしたところ、最長 11.4Kb の deletion を起こしたマウスを作製することができた。今後は、このマウスを交配させて C 末端欠損マウスを樹立し、表現型の解析を行う予定である。このように受精卵を用いたゲノム編集でも 10Kb を超えるような deletion が可能となっており、indel 変

異による予期できない variant による機能回復を回避するために、大規模なゲノム領域の deletion による機能欠損マウスを優先して作製していく予定である。

CRISPR-Cas9 による内在性 exocyst subunits の機能解析

Exocyst は Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 の 8 つのサブユニットから構成される複合体であり、exocytosis の際に分泌小胞を細胞膜へ繫留する tethering factor として機能する。Exocyst はインスリンや神経伝達物質などのシグナル分子の分泌に寄与するだけでなく、細胞分裂、シリア形成、細胞運動、細胞極性、オートファジーなど様々な生命現象にも関与する。これまでに、Sec10, Sec15, Exo84 の C 末端に GFP を融合したノックイン細胞は、タグ付けに起因する機能障害により細胞分裂異常が起こるため、株化が不可能であった。そこで、GFP タグによる立体障害を回避する目的で、V5, HA などの短いペプチドタグの挿入を計画した。Cas9 タンパク質, crRNA, single strand DNA を 4D Nucleofector により遺伝子導入する事により高効率で HDR が起きる手法を用いた。その結果、Sec15-V5, Sec15-HA, Exo84-HA を樹立することに成功した。今後、これらのノックイン細胞株を用いて Sec15, Exo84 の機能解析を行う。

愛媛大学プロテオサイエンスセンターの澤崎達也博士との共同研究を行い、細胞内での標的タンパク質機能解析に適した新たなケミカルノックダウンシステムの開発に携わった。本研究の成果を 2020 年 9 月にプレスリリースした。

【論文・総説等】

1. Yamanaka S, Shoya Y, Matsuoka S, **Nishida-Fukuda H**, Shibata N, Sawasaki T. An IMiD-induced SALL4 degron system for selective degradation of target proteins *Commun Biol.* 3(1): 515. 2020.
2. Aoki Y, Tsujimura A, Kaseda K, Okabe M, **Tokuhiro K**, Ohta T, O'Bryan MK, Okuda H, Kitamura K, Ogawa Y, Fujiki T, Wada M, Horie S, Nishimune Y, Tanaka H. Haprin-deficient spermatozoa are incapable of in vitro fertilization *Mol Reprod Dev.* 87(5):534-541. 2020.

【主な学会発表】

1. 徳弘圭造、「透明帯を介した多精子受精阻害機構」第 24 回 日本臨床エンブリオロジスト学会 web セミナー、2020 年
2. 庄屋祐希、山中聡士、**福田尚代**、柴田哲男、澤崎達也、「標的タンパク質の選択的分解のための IMiD 誘導性 SALL4 デグロンシステム」第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年

3. 福田尚代、徳弘圭造、松下博昭、安東由喜雄、和田守正、田中宏光、「**HASPIN** 阻害剤 **CHR-6494** の乳がん細胞増殖抑制効果の検証」第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年

○細胞機能部門

<研究概要>

本部門は、関西医科大学附属生命医学研究所において2018年に設置された部門である。医学・生命科学において、その研究対象となるカテゴリーは、「そのもの」「機能」「メカニズム」「発生」「戦略・技術開発（基礎研究技術から治療・創薬・産業技術も含む）」の5つに大きく分けられる。このなかで、「そのもの」とは、体内において働く機能単位「遺伝子」「細胞」「神経回路」「領域」であり、脳神経系においては、現在でも未発見の「細胞」「神経回路」「領域」がまだ多く潜在している可能性が高くある。本部門では、脳神経系において「そのもの」の発見、すなわち、新たな「細胞」、「神経回路」、「領域」を発見・解明することを第一の目標としている。さらに本部門の第2の目標として、脳の記憶中枢である海馬を介した記憶メカニズムの解明を目指している。そして第3の目標として、「そのもの」の探索、「機能」「メカニズム」の解明を大きく促進させる「新規戦略技術の開発」を目指している。

海馬は、百年以上も前から最も精力的に研究されている脳領域のひとつであり、脳の記憶中枢として知られている。近年になり、海馬において従来の常識、定義を根本から覆す研究が出現するようになり（アルトマンらによる成体海馬における新生神経細胞の発見 1962、オキーフらによる場所細胞の発見 1971、小原らによる新CA2領域の解明 2014）、今後もさらに新たな「細胞」「神経回路」「領域」が出現する機運が高まってきている。私たちは、新CA2領域特異的遺伝子組換えCreノックインマウス(MAP3K15-Cre knock in mouse)、遺伝子組換えレンチウイルスおよびアデノ随伴ウイルス(AAV)、光遺伝学、電気生理学、光イメージングなどを駆使して、記憶中枢部位海馬および海馬近傍領域において、新たな「細胞」「神経回路」「領域」の探索、解明を行っている。

「新規戦略技術の開発」においては、世界に先駆けて「導入遺伝子の戦い」という新たな概念を創出した。そしてその概念に基づき、遺伝子組換え酵素Cre、FLPO同士を戦わせる新規戦略技術「BATTLE」の開発に成功した。「BATTLE-1」技術を用いて、海馬において複数の遺伝子を反発分離状に導入させることに成功した。また「BATTLE-2.1」技術により、複数の海馬神経細胞をまばらに可視化することにも成功した。そして「BATTLE」技術と膨張顕微鏡技術を融合させた複合技術「BATTLE-1EX」を開発し、海馬において、シナプスの全体像とシナプス構成タンパク質の局在の同時に、高精細に可視化することに成功した。

また産学連携活動としては、Nikon インステックとの顕微鏡に関する共同研究と Nikon Joico Award に関する活動および、NPO 特定非営利活動法人脳の世紀推進会議の活動を行い、研究成果の社会への還元を推進している。

学術論文

1. Kohara K, Inoue A, Nakano Y, Maruyama M, Baba R, Kawashima C. BATTLE: Genetically Engineered Strategies for Split-Tunable Allocation of Multiple Transgenes in the Nervous System. *iScience* 23, 101248, June 26, 2020

学会発表

1. Kohara K, Inoue A, Nakano Y, Hirai H, Kobayashi T, Maruyama M, Unzai T, Baba R, Kawashima C. Battle of recombinases and novel genetically engineered strategies for split-tunable expression of multiple transgenes in the nervous system. The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Kobe, Japan), 2020/07/29-08/01
2. Taketo M. Function of metabotropic glutamate receptor 1 in the neonatal hippocampal marginal zone. The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Beppu, Japan), 2020/03/17-19
3. Taketo M. Function of type 1 metabotropic glutamate receptors in the neonatal rat hippocampal marginal zone. 9th FAOPS CONGRESS in conjunction with The 96th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Kobe, Japan), 2019/03/28-31
4. Hoque KM, Saha T, Aoun J, Hayashi M, Sheikh IA, Leblanc N, Sarkar P, Ameen N, Woodward OM. Intestinal TMEM16A function as a luminal chloride channel. *The FASEB Journal* 2020; 34: s1.06115
5. 岩田亮一，林美樹夫，埜中正博，浅井昭雄
GBM に対する ICOSLG を標的とした新規治療法の開発
第 30 回日本サイトメトリー学会学術集会，S2-2，枚方，2020 年 5 月（誌上開催）

○総合研究施設

<研究概要>

関西医科大学附属生命医学研究所総合研究施設（以下綜研）は、平成25年4月の枚方学舎移転後、臨床系総合研究施設（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、総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、総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28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	平成27年度～平成28年度	伊藤誠二 中邨智之
	平成29年度～平成30年度	中邨智之 木梨達雄
	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
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	平成27年度～平成28年度	平野伸二 豊田長興
	平成29年度～平成30年度	松村伸二 神田晃
	令和元年度～	日笠幸一郎 神田晃
事務長	平成27年度～令和元年度	阪井保博
	令和2年度～	奥田耕市

齊藤育、権田裕之、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たが、平成25年6月より坂田喜子が臨床系綜研の専任技師として着任した。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年度からはRI施設にSPECT-CTが導入されたが、非RIサンプルの測定については坂田が臨床系綜研の業務の一貫としてサポートを行っている。平成28年度導入された3Dプリンターは装置の保守管理・ソフトの使用方法のサポート・装置のオペレーションをサポートしている。

予決算

平成28～平成30年度予算は26,100,000円。いずれも予備費5,000,000円を含む総額。令和元年度は32,107,000円。令和2年度は32,187,000円。次世代シーケンサー運用費、予備費それぞれ5,000,000円を含む。

令和2年度は決算見込み

		平成28年度	平成29年度	平成30年度	令和元年度	令和2年度
運営費	消耗品費	19,325,911	8,742,710	8,383,958	13,593,724	15,200,000
	修繕費	7,270,963	7,713,122	13,351,671	8,130,087	12,930,000
	業務委託費	3,874,339	3,117,413	3,999,528	6,058,820	3,500,000
	その他支出	8,784	1,604	1,080	2,160	27,000
	戻入金	-8,265,973	-7,775,585	-8,323,967	-9,646,473	-8,500,000
	小計	22,214,024	11,799,264	17,412,270	18,138,318	23,157,000
機器備品費		0	9,233,352	3,628,476	8,648,686	9,030,000
執行額合計		22,214,024	21,032,616	21,040,746	26,787,004	32,187,000

H28年度 *3Dプリンター設置に伴う費用 消耗品費 113,616
修繕費 1,031,400

機器設備の整備

令和2年12月20日現在

	設備名/機器名		システム総額	総研負担額
平成28年度	高精度3D/4D画像解析ソフトウェア inForm Cell Analysis	総研運営費		2,937,600
	組織標本解析ソフトウェア IMARIS (フィラメントトレーサー)	総研運営費		2,754,000
	NGC クロマトグラフィーシステム	総研運営費	7,121,044	2,477,044
	※ 3Dプリンターシステム EDEN260VS	H28年度文科省2/3助成	17,280,000	大学負担 7,110,000
平成29年度	クロマトチャンバー MC-20EF3	総研機器備品費		736,560
	マイクロフォージ MF-900	総研機器備品費		496,800
	フローサイトメーター Attune NxT AF Cytometer Blue/Red Lasers	総研機器備品費		7,999,992
	共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000	予算外執行	30,034,098	0
平成30年度	除振ユニット	総研機器備品費		820,800
	オートクレーブ	総研機器備品費		504,900
	超低温層	総研機器備品費		655,560
	CO ₂ インキュベーター	総研機器備品費		1,647,216
	次世代シーケンサーMiSeqシステム	H30年度文科省2/3助成	13,996,800	大学負担 4,888,800
令和元年度	ケミルミイメーキングシステム 一式	総研機器備品費		3,102,880
	万能核酸精製装置	総研機器備品費		2,156,000
	バイオハザードセイフティキャビネット	総研機器備品費		1,219,536
	スライドレスセルカウンター	総研機器備品費		988,900
	MSシステムLegacyパッケージ 一式	総研機器備品費		874,800
	CT画像解析用PC	総研機器備品費		306,570
令和2年度	スイングローター P40ST	総研機器備品費		2,191,200
	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	大学負担 34,767,300
	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	4,773,930

平成 28 年度：高精度 3D/4D 画像解析ソフトウェア inForm Cell Analysis、組織標本解析ソフトウェア Imaris Track・Filament Tracer が綜研運営費により導入された。また、病態分子イメージングセンターが FPLC の後継機として NGC クロマトグラフィシステムを購入することになり、システムの一部部品を綜研運営費で購入した。画像支援モデル開発委員会購入の 3D プリンターを綜研オープンラボ 1 室に設置することとなった。3D プリンターの使用は上記委員会に申請が必要で、管理部署である研究課に依頼書を提出、現在のところ綜研は作成したデータのチェックと機器の運転、消耗品の管理にあたっている。

平成 29 年度：綜研機器備品により、クロマトチャンバー・マイクロフォージ・フローサイトメーター Attune を購入した。年度末、予算外執行により共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV3000 を導入した。

平成 30 年度：平成 30 年度文科省 2/3 助成により次世代シークエンサー MiSeq システムが導入された。綜研機器備品により、前年度購入の FV3000 の除振ユニットを購入した。台風 21 号による被害で BH 室機器が故障したため、オートクレーブ、超低温槽、CO2 インキュベータを更新した。

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・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・Attune NxT フローサイトメーターアップグレードが採択され年度内に導入予定である。

綜研利用登録者数の変遷と主な装置の使用状況

令和2年12月20日現在

	平成28年度	平成29年度	平成30年度	令和元年度	令和2年度
登録者数	347	333	386	395	397
登録者中大学院生	93	75	65	68	70
登録者中学部学生	---	---	22	29	37

--- データなし

令和2年度は誤った使用による事故や、機器の破損が発生した。これらを繰り返さないためにも装置の正しい使用方法を徹底することが課題である。

主な装置について、設置場所別に過去10年の使用実績を下表に示した。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。コロナ対策の一環で、研究者のニーズに応じてできる限り少人数で複数回に分割して説明会を開催、また各メーカーによるオンラインセミナー等も導入している。

購入年度	設備名	設置場所	2011年度～2020年度 (H23～R2) までの 使用累計回数
H26	MACS組織細胞精製システム (AutoMacSPRO_GentleMacS)	オープンラボ1	334
H28	3Dプリンターシステム (EDEN260VS)	オープンラボ1	118
H27	遺伝子解析装置 (nCounter DX Analysis System-FLEX)	オープンラボ1	87
H23	MALDI-IT-TOF型顕微質量分析装置 (質量顕微鏡特型機)	質量顕微鏡室	1007
H21	トータル細胞可視化解析システム (FV1000)	多光子顕微鏡室	895
H24	高度細胞機能解析蛍光イメージングシステム (ArrayScan)	生体分子イメージング室	146
H23	HSオールインワン顕微鏡 (BZ9000)	生体分子イメージング室	1623
H24	高度細胞機能解析蛍光イメージングシステム (ImageStreamX MkII)	生体分子イメージング室	284
H23	近赤外蛍光イメージャー (Odyssey Sysvtem)	生体分子イメージング室	444
H22	高速蛍光イメージングシステム (AF6500)	光学顕微鏡室	1085
H24	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 (ArcturusXT)	光学顕微鏡室	60
H29	共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV3000)	光学顕微鏡室	1174
H15	生体内分子機構画像解析システム (LSM510-META)	光学顕微鏡室	3520
H25	共焦点顕微鏡 (LSM700)	光学顕微鏡室	3323
H18	細胞微細構造透過解析システム (JEM-1200A)	電顕室	346
H20	高性能高速冷却遠心機 (Avanti HP-30I)	生化学実験室1	1094
H20	ルミノイメージアナライザー (LAS 4000mini)	生化学実験室1	3490
H21	マルチラベルプレートリーダー (EnSpire)	生化学実験室1	2393
H24	タンパク質構造解析システム (MALDI TOF/TOF 5800)	生化学実験室2	173
H14	生体機能のポストゲノム解析システム (GeneticAnalyzer3100 H23年度3130x1へupgrade)	生化学実験室2	44387 (サンプル数)
H29	マイクロフォージ (MF-900)	生化学実験室2	91
H24	リアルタイムPCR (RotorGeneQ)	生化学実験室2	1756
H21	リアルタイムPCR (RotorGeneQ HRM)	生化学実験室2	2679
H30	次世代シーケンサー (MiSeq system)	生化学実験室2	7
H21	トータル細胞可視化解析システム (FACSCalibur)	細胞解析室	3378
H19	先端医療開発のための高度細胞機能解析・評価システム (FacsCantoII)	細胞解析室	5458
H17	先端医療開発のための細胞自動解析・評価システム (先端医療開発のため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 (H27) を含む) (FACSAriaI) (FACSAria UVレーザー (H18)) (FACSAriaI→IIu upgrade (H27))	細胞分取室	2032
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	1344

○実験動物飼育共同施設

<研究概要>

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 m²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 (2,000 m²) に移転し、現在の実験動物飼育施設は空調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状況となった。実際、近年本学においては、日本学術振興会の科研費をはじめ、JST 科学技術振興機構の CREST (実験病理学講座)・A-STEP (神経機能部門)、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、これらに本実験動物飼育共同施設を利用した動物実験が大きく貢献している。さらに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。

同施設は、教授会により選出された施設長 (令和 2 年現在・平野伸二・生物学教室教授) の管轄のもと、専任および非常勤の職員 (令和 2 年現在・高岩郁江、川村清久) 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 年度からは、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・分子遺伝学部門教授) に採択された事により施設が整備され、新たに飼育管理業務一般を請け負う 2 名の委託業務員を雇用し、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 (施設長、動物実験委員会委員長 (令和 2 年現在・中邨智之・薬理学教授)、実験動物管理者 (令和 2 年現在・李成一・モデル動物部門准教授))、動物実験管理委員会、および利用各講座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 26～令和元年度における、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 14 頭のサルが飼育されており、大脳高次機能 (生理学) 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 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	平成 31 年 度 (令和元年 度)
マウス	6570 匹	5153 匹	5564 匹	4938 匹	4142 匹	4950 匹
ラット	1302 匹	847 匹	641 匹	622 匹	698 匹	606 匹
モルモット	15 匹	39 匹	164 匹	56 匹	27 匹	31 匹
スナネズミ	0 匹	0 匹	0 匹	10 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	67 羽	40 羽	23 羽	51 羽	61 羽	41 羽
サル	14 頭	14 頭	14 頭	14 頭	14 頭	12 頭

*：年度末の統計

表 2. 利用登録研究者数*

平成 26 年 度	平成 27 年 度	平成 28 年 度	平成 29 年 度	平成 30 年 度	平成 31 年度 (令和元年 度)
222 名	226 名	200 名	168 名	253 名	203 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」改正にともなう「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、教授会および助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おこなっている。

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霊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対策を取ることで進めたが、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）。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てことを反省し、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し、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、実験動物の搬入時で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」（いわゆるカルタヘナ法）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について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、利用者の理解と協力が不可欠である。そのため平成 27 年度より、毎年利用代表者への再教育訓練を行い、教育の強化を図っている。しかし、令和元年には針刺し事故も起きた。そのような事故等がないように、今後も施設管理や利用者への教育に力を入れていく。

◎ 今後の展望

平成 25 年度の学舎移転にともない、現在の近代的な実験動物共同飼育施設が開設された。これからも最適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、適切な施設運用をしていくことが望まれる。

○アイソトープ実験施設

<研究概要>

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、専任及び非常勤の職員で構成されている。業務は、法律、予防規程に基づいて管理、運営している。

I.概要

平成元年～6年の主に H-3、S-35、I-125 の核種が、ラジオイムノアッセイ、標識リガンドによるレセプターアッセイ、標識アミノ酸を用いた細胞内タンパク質合成、動物投与による代謝実験などに使用されていた。

平成7年～14年、P-32 の急激な使用量および登録者数が増大し、本学におけるゲノム研究の到来であった。臨床、基礎講座を問わず、多くの研究室、研究員が遺伝子の解析に邁進していた時代であり、施設は大いに活性化していた。

平成15年以降になると使用数量が減少した。これは本学におけるポストゲノムの時代に突入したこと、遺伝子およびタンパク質の機能解析へと研究がシフトするとともに RI 試薬の代替品が開発されたことが原因である。

平成19年以降、Tc-99m、Tl-201 などの短半減期核種が使用されはじめた。動物レベルにおける生体内の代謝の評価・がん細胞の viability の検討・薬物動態の研究等が活発になってきたことが原因である。その解析の手法としての分子イメージングがあるが、Tracer に蛍光試薬ではなく核医学の分野で用いる放射性同位元素を利用するものである。

平成26年には、SPECT/CT が導入された。平成25年まで RI 使用数量が減少傾向にあったが、イメージング核種の使用量が増加し今まで使用のなかった治療用核種も使用され始めた。これらは標的分子に高い親和性を有する物質を放射性核種で標識して生体内に投与し、RI から放出される γ 線を SPECT 装置でのイメージングに用い、 β 線を治療に用いるものである。その結果、疾患の解明や薬物治療効果の評価ができるようになり、臨床での診断や医薬品開発に大いに役立つことが期待される。

平成31年3月に、 α 線放出核種 At-211、Ac-225 の使用許可を得た。 α 線を治療に用いる実験も注目されつつある為、今後は α 線を利用した実験が予想される。一方、RI を使用せず、CT を利用した実験も増加しつつある。また、血管撮影装置も備わっており、今後 RI 非使用の実験の拡大が予想される。当施設が RI 使用を前提にした施設ではなく、多様な目的に対応した施設になることが期待される。

II.利用状況

表 1 に平成 26 年度から令和 2 年度における核種別使用（払出）数量を、表 2 にガンマセル照射時間、表 3 に利用登録者数を示す。今後、登録者数および利用率向上の為、機器更新や利用者の希望する機器の導入等を検討し活性化を図る。

表 1：核種別使用（払出）数量*（単位：MBq）

	平成 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年 度	令和元年 度	令和 2 年 度**
H-3	36	13	23	0	9	25	4
P-32	57	63	81	37	19	9.25	0
Y-90	27	37	0	0	74	148	0
I-123	0	0	0	0	0	0	464
I-125	11	216	252	104	86	821	149
I-131	0	0	0	0	0	0	703

*小数点以下は四捨五入

**令和 2 年 11 月 30 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 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	令和元年 度	令和 2 年 度**
照射時間	3318	2448	2704	1187	1245	1197	1044*

*小数点以下は四捨五入

**令和 2 年 11 月 30 日現在の統計

表 3：利用登録者数

	平成 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	令和元年 度	令和 2 年 度**
RI 登録者	91	87	66	48	45	38	46
ガンマセル登録者	29	29	32	43	49	39	38

**令和 2 年 11 月 30 日現在の統計

Ⅲ. 関連法令の変遷

平成 12 年、放射線障害防止法の大幅な改正（ICRP『勧告』の導入）が行われ、平成 13 年 4 月 1 日に施行された。主な改正点は人への影響（被ばく線量）が大幅に強化されたことである。それに伴って外部被ばく線量算出のため許可使用核種等の見直しが迫られ、平成 15 年 1 月 16 日に新しく許可証が交付された。

平成 16 年、放射線障害防止法及び関連政省令等の一部改正が行われた。この改正は国際原子力機関などが策定した『国際基本安全基準』で提唱されている免除レベルを放射性同位元素の規制下限数値として導入された点などである。本学では、国際免除レベルの導入は見送り、より安全性の高い現濃度限度を引き続き採用することとした。さらに、RI の使用実態を考慮した変更許可申請書を文部科学省に提出し、平成 18 年 3 月 16 日に許可証が交付された。

平成 17 年 2 月 24 日、「放射性同位元素等の管理の徹底及び管理下でない放射性同位元素の点検について」の報告書を文部科学省に提出した。再度、平成 21 年 6 月 25 日に同様の点検依頼があり報告書を文部科学省に提出した。

平成 22 年 4 月 28 日、放射線障害防止法が改正された。今回の改正はクリアランス制度の導入、RI 事業所の廃止手続の強化、罰則の強化である。

平成 24 年 12 月 20 日、枚方での新施設の許可証が交付された。新施設ではアイソトープ実験施設に加え、ガンマ線照射施設を管理することとなった。

平成 29 年 4 月 14 日、放射線障害防止法が改正された。特定放射性同位元素に対する防護措置などが主な改正点となっている。本学では、ガンマセルに格納されている RI が防護措置の対象となるが、許可証上の放射エネルギーによって防護措置の規制レベルが区分されるため、実際の放射エネルギーに減衰補正した許可証の交付申請をする必要があった。さらに、 α 線放出核種の使用希望があったため、それらを考慮した変更許可申請書を原子力規制委員会に提出し、平成 31 年 3 月 20 日に許可証が交付された。

Ⅳ. 規程

放射線障害防止法に基づき本学の RI の取扱、管理、放射線障害の発生の防止、特定放射性同位元素の防護、職員の健康及び学内外の安全を確保する為に放射線障害予防規程（以下、予防規程と略記する）及び特定放射性同位元素防護規程（以下、防護規程と略記する）を設けている。この規程は、法律、政令、施行規則の改正等の度に改定している。主な改定について下記に記す。

- 1.平成 13 年 4 月 1 日.予防規程の大幅改定（ICRP1990 年勧告の導入）
- 2.平成 17 年 6 月 10 日.予防規程の改定（国際免除レベルの導入）
- 3.平成 22 年 9 月 1 日.予防規程の作成（大学内の放射線施設ごとに規程を作成）
- 4.平成 25 年 2 月 1 日.新予防規程の作成（新枚方施設における規程を作成）
- 5.令和元年 7 月 1 日.予防規程の改定（大幅な法改正に伴う改定）
- 6.令和元年 9 月 1 日.防護規程の作成（大幅な法改正に伴う作成）

編集後記

2020年は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が全世界を襲い、社会の様々な活動に甚大な被害を与えた。附属病院は重症者を受け入れ、日夜 COVID-19 と戦っており、本当に頭が下がる思いである。本学の研究に関しては、動物施設の運用に多少の影響がでているが、いまのところ最小限にとどまっているのは幸いである。しかし、研究会や学術集会など、直接の交流が制限されている。大学における教育、研究活動はコミュニケーションが大きな比重を占めていることが痛感される。COVID-19の特効薬は今のところなく、ワクチン開発が今後の流行の鍵となる。そのワクチンも時間がかかる従来のウイルスタンパク質を用いたワクチンから、製造が容易な RNA を用いた核酸ワクチンが主流になり、いち早く承認された。ここにも基礎医学の重要な成果があり、RNA ワクチン技術はこれまでの核酸医薬の研究成果が応用されている。今後、いろいろな分野で使用されていくことであろう。次世代の治療法は現在の基礎研究に根差している。その方向性を見出すのは大変であるが、そこが研究の醍醐味である。