

関西医科大学
附属生命医学研究所紀要

第 16 号

2 0 2 1

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年度にゲノム編集部門、ゲノム解析部門が設置されました。令和3年度に新たに「がん生物学部門」が設置され、坂本毅治学長特命教授が7月に着任されました。坂本先生はがん微小環境における低酸素応答に注目してがんの病態を研究してこられました。研究所は、各部門の免疫・神経・代謝、発生、ゲノム医学、がんの分野を中心として活動し、学内基礎・臨床の共同研究、学内研究振興策であるKMUコンソーシアムを推進しています。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。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。

附属生命医学研究所 所長 木梨達雄

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 安河内 彦輝 (2021.8～)

○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～)

○がん生物学部門

学長特命教授 坂本 毅治 (2021.7～)

助教 田中 伯享 (2022.1～)

[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、極性形成が効率低下した。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。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 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。逆に RapGAP のノックアウトでは basal の RhoA の活性化、ミオシン軽鎖のリン酸化が更新していた。よって RhoA の制御およびミオシンの活性化・局在の破綻が 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、現在その調節因子を解析している。

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 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、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 が活性化していたが、一方で興味深いことに、Flow 条件下ではインテグリン-インテグリンリガンドの組み合わせに違いがあることを見出した。また「Rap1 センサー」発現 BAF 細胞株を樹立し、Flow 条件下での Rap1 活性化をイメージングする観察系を前年度に立ち上げていたが、この観察系を用いて、rolling を開始する糖鎖型セレクトインリガンド CD34 のみならず、接着分子 ICAM-1 にも rolling を支持する能力があることを T 細胞で発見し、日本免疫学会で報告した。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の活性化における Kindlin-3 (Kin3) の新機能の発見

Kin3 は LFA-1(α L β 2)の細胞内領域と直接結合し LFA-1 の活性化に伴う構造変化を促進する細胞内因子であるが、その詳細な分子機序は不明であった。本研究ではこれまでに確立した実験系を用いて、LFA-1の活性化における Kin3 の新機能を発見した。LFA-1 は定常状態では α - β 鎖間で形成される細胞内の塩橋が留め金となり、構造変化が抑制された状態にある。Kin3 の欠損により LFA-1 依存的な細胞接着は低下するが、留め金を外す変異を持つ LFA-1 を発現する Kin3 欠損細胞では細胞接着能が回復した。LFA-1 に対する Kin3 の細胞内一分子結合解析を行ったところ、留め金をなくす α 鎖側の変異では Kin3 の結合は増強したが、 β 鎖側の D731A 変異では Kin3 の結合は低下した。また β 鎖細胞内領域と Kin3 との物理的結合を pull-down アッセイにより解析したところ、D731A 変異により Kin3 との結合は低下した。さらに Kin3 の N 末端領域 F0 ドメインに β 鎖 D731 残基が結合することを見出し、F0 の欠失により Kin3 による LFA-1 の活性化が低下することが分かった。以上のことから Kin3 は β 鎖 D731 残基と結合し LFA-1 の留め金を外す新しい役割を持つことが示唆された (Kondo *et al.* (2021) *Sci. Signal.*)。今後この過程と他の細胞内因子との関連を精査し LFA-1 活性化機構の全容解明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 α v β 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。そこで本病態の治療に向けて、インテグリン機能を制御する薬剤の開発を行なった。その結果、これまでに複数のインテグリン阻害薬を同定した。これらの阻害剤によって神経膠芽腫細胞の増殖は阻害された。一方で、正常細胞においては同濃度帯において増殖の阻害が観察されなかったことから、インテグリン阻害薬は有効な治療法である可能性が高い。今後はこれらの薬剤群について、その阻害効果についての検証を進めることで、インテグリンを標的とした神経膠芽腫治療法の確立について推し進める。また、このインテグリン阻害薬を使ってインテグリンが及ぼす神経膠芽腫の増悪化メカニズムに迫る。

<List of Publication>

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. Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Ikeda Y, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N., Female dominance of both spatial cognitive dysfunction and neuropsychiatric symptoms in a mouse model of Alzheimer's disease, *Exp Anim.*, 2021 Aug 6;70(3):398-405. DOI: 10.1538/expanim.21-0009. Epub 2021 Apr 9.

2. Ikeda Y, Hirayama A, Kofuji S, Hirota Y, Kamata R, Osaka N, Fujii Y, Sasaki M, Ikeda S, Smith EP, Bachoo R, Soga T, Sasaki AT. SI-MOIRAI: A new method to identify and quantify the metabolic fate of nucleotides, *J Biochem.*, 2021. 7, Online ahead of print. 2022 Jan 7;170(6):699-711. DOI:10.1093/jb/mvab077.
3. Kondo N, Ueda Y, Kinashi T, Kindlin-3 disrupts an intersubunit association in the integrin LFA1 to trigger positive feedback activation by Rap1 and talin1, *Sci Signal.*, 2021, Vol 14, Issue 686. DOI: 10.1126/scisignal.abf2184

(総説)

1. Osaka Natsuki, Hirota Yoshihisa, Ito Doshun, Ikeda Yoshiki, Kamata Ryo, Fujii Yuki, Chirasani Venkat R., Campbell Sharon L., Takeuchi Koh, Senda Toshiya, Sasaki Atsuo T., Divergent Mechanisms Activating RAS and Small GTPases Through Post-translational Modification, *Front Mol Biosci.*, 2021 Jul 8;8:707439. DOI: 10.3389/fmolb.2021.707439. eCollection 2021.

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. N. Kondo, Y. Ueda, T. Kinashi, Kindlin-3 breaks of integrin LFA-1 inhibitory clasp to promote positive feedback activation of LFA-1 by talin1 and Rap1, The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology ,2021 Dec.8 (1-C-WS3-18-P), Nara.
2. Y. Ueda, K. Higasa, Y. Kamioka, N. Kondo, T. Kinashi, Rap1 facilitates T cell polarity via spatial regulation of MLC and ARAP1, The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology ,2021 Dec.8 (1-D-WS4-19-P), Nara.
3. Y. Kamioka, Y. Ueda, N. Kondo, T. Kinashi, Differential requirement of Rap1 and integrin adaptors for distinct modalities of T cell adhesion under shear flow, The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology ,2021 Dec.8 (1-C-WS3-17-O/P), Nara.
4. 池田 幸樹, インテグリンとインテグリン結合性タンパク質間の相互作用の定量化, 第44回日本分子生物学会年会(The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan),2021 Nov. 2[2LBA-073], 横浜
5. 近藤 直幸, 細胞内アダプタータンパク質の一分子動態計測によるインテグリン LFA-1 活性化機構の解明, 第94回日本生化学大会(The 94th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society), 2021 Nov 3 [1T13e-05 (P-682)], Web 開催

③ 著 書 (著者名、書名、出版社名、発行年)

1. 植田祥啓 3章 免疫の働き (担当編者: 八村敏志・北澤春樹) 3-6 リンパ管とリンパ節の働き (部分執筆) 食品免疫学事典 日本食品免疫学会編集 朝倉書店 2021

年 11 月 01 日 ISBN : 978-4-254-43126-1

○モデル動物部門

<研究概要>

再生医療技術を用いたアルツハイマー型認知症の治療法開発 (村山 正承)

アルツハイマー型認知症は認知機能に影響を与える神経変性疾患である。加齢・性別・精神神経症状 (neuropsychiatric symptom: NPS) 感受性などはアルツハイマー型認知症発症の危険因子であると考えられている。アルツハイマー型認知症モデルマウス (PDAPP Tg マウス) を用いてこれらの危険因子に着目した行動解析・統計解析を実施した。その結果、PDAPP Tg マウスのメスは空間学習能異常と NPS が認められる一方で、PDAPP Tg マウスのオスはどちらも正常であった。また興味深いことにオスメス共に PDAPP Tg マウスの空間参照記憶能は正常だった。重回帰分析より空間学習能は NPS の不安行動・うつ症状に、空間参照記憶能はうつ症状に関連があることが明らかとなった。このようにアルツハイマー型認知症モデルマウスの性質を理解することはアルツハイマー型認知症発症機構の解明だけでなく治療薬・治療法の開発に有用である (Murayama MA, et al., *Exp Animals*. 2021;70(3): 387-397)。

海馬は認知機能を司る脳の領域である。これまでにアルツハイマー型認知症モデル動物の海馬への神経細胞移植が認知機能の改善に繋がることが報告されている。本研究では PDAPP Tg マウスおよびヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いて、アルツハイマー型認知症モデルマウスへの神経細胞移植における認知機能の改善と NPS の改善に焦点を当てた。その結果、神経細胞の PDAPP Tg マウスへの移植は空間学習能だけでなく空間参照記憶能の改善に加えて、NPS (不安行動・うつ症状) を改善することを見出した。興味深いことにこれら NPS の改善は空間学習能の改善と相関が認められたが、空間参照記憶能との相関は認められなかった。また、移植した神経細胞はコリン作動性神経、GABA 作動性神経に分化することを見出した。これらの結果から、神経細胞移植による認知機能および NPS の改善はいくつかの作用機序によってもたらされることが明らかとなった (Murayama MA, et al., *Exp Animals*. 2021;70(3): 398-405)。これらの研究成果により日本実験動物学会奨励賞の受賞に内定した。

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、従来のもよりも効率的な癌治療に結びつくことを期待している。

<List of Publication>

原著論文

1. Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N. Dementia model mice exhibited improvements of neuropsychiatric symptoms as well as cognitive dysfunction with neural cell transplantation. *Exp Animals*. 2021 Aug 6;70(3): 387-397.
2. Murayama MA, Arimitsu N, Shimizu J, Fujiwara N, Takai K, Ikeda Y, Okada Y, Hirotsu C, Takada E, Suzuki T, Suzuki N. Female dominance of both spatial cognitive dysfunction and neuropsychiatric symptoms in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Animals*. 2021 Aug 6;70(3): 398-405.

総論

1. Shimizu J, Murayama MA, Suzuki N. Relationship between skewed T cell differentiation and gut microbiota alternation in human immunological disorders. *The Allergy in Practice*. 2020 Dec 15;40(14):1210-1214.
2. Murayama MA. The next therapeutic target in osteoarthritis: CTRP3. *The Allergy in Practice*. 2021 Mar 20; 41(3): 225-228.

3. Murayama MA. The importance of neuropsychiatric symptom in Alzheimer's disease. *Precision Medicine*. 2021 May 25; 4(5): 467-469.
4. Murayama MA. The experimental model mice to understanding of rheumatoid arthritis: a brief review. *The Allergy in Practice*. 2021 May 21;41(6):533-535.
5. Shimizu J, Murayama MA, Suzuki N. Relationship between skewed T cell differentiation and gut microbiota alternation in human immunological disorders. *The Allergy in Practice*. 2021 Jun 23;41(7):618-622.
6. Murayama MA. The experimental models for osteoarthritis. *Precision Medicine*. 2021 Aug 25; 4(9):896-898.
7. Murayama MA. The experimental models for psoriasiform dermatitis. *The Allergy in Practice*. 2021 Sep 30; 41(10): 889-891.
8. Murayama MA. The therapeutic effect of iPS cells-derived neural cell transplantation into dementia model mice. *The CELL*. 2021 Oct 20; 53(11): 710-711.
9. Murayama MA. The regenerative medicine for Alzheimer's disease, focused on neuropsychiatric symptom. *Bessatsu BIO Clinica*. 2021 Sep 30; 10(2): 119-122.
10. Arimitsu N, Murayama MA. Immunopathology in multiple sclerosis and experimental models. *The Allergy in Practice*. 2021 Nov 20;41(13):1208-1211.
11. Shimizu J, Murayama MA, Suzuki N. Relationship between skewed T cell differentiation and gut microbiota alternation in human immunological disorders. *Precision Medicine*. 2021 Dec 12; 4(14): 1379-1383.

学会発表

- 1.鈴木登, 村山正承, 高田えりか, 高井憲治, 有光なぎさ, 廣津千恵子. 腫瘍免疫での免疫チェックポイントに対するニコチンの影響. 喫煙科学研究財団令和2年度研究発表会. 東京都. 2021年9月2日. 口頭発表(Web開催).
- 2.村山正承, 徳弘圭造, 福田尚代, 上岡祐治, 植田祥啓, 岩井大, 神田晃, 埜中正博, 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及び応用を目指した基礎研究. 第5回関西医科大学学術祭. 大阪府. 2021年11月5日. 口頭発表.
- 3.村山正承. 変形性関節症の治療法開発を目指した、軟骨細胞増殖制御機構の解明. 第5回関西医科大学学術祭. 大阪府. 2021年11月5日. ポスター発表.
- 4.大高 時文, 山岸 誠, 水池 潤, 本間 大輔, 李 成一, 中嶋 伸介, 上野 孝治, 内丸 薫, 大隈 和, 藤澤 順一. HTLV-1感染ヒト化マウスにおける EZH1/2 阻害剤 Valemetostat の HTLV-1 感染抑制効果. 第7回日本HTLV-1学会学術集会. 熊本市. 2021年11月5日～7日. ポスター発表.
- 5.高岩 郁江, 川村 清久, 李 成一, 平野 伸二, 木梨 達雄. マウス肺パスツレラ菌感染事故における経過と対応(主に、エンロフロキサシン治療について). 第55回日本実験動物技術者協会総会. 岐阜市. 2021年10月14日～16日. ポスター発表.

○神経機能部門

<研究概要>

生物は生命の危機的状況において、潜在的な生体防御能力を用いて自らを守る。ヒトでも危機に関連した刺激、例えば、溺死寸前の低温浸漬による三叉神経活性化で誘導される潜水反射や、恐怖知覚による迷走神経反射などによって、恒常性を維持する状態から大きく逸脱した生理状態が誘導される。これらの反射は、生命を守る能力として進化してきたと考えられているが、これらの効果を利用した臨床応用はまだ確立されていない。

先天的な恐怖情動は、危機を感知した脳により誘導されるのだから、危機状態での生命維持と密接に関係すると考えられる。しかし、モデル動物に対して恐怖情動を効率的に誘導できる刺激法が未開発であることが大きな障害の一つとなり、恐怖情動に関連する潜在的な保護能力の解明を進めることができていなかった。このような背景で私たちは、げっ歯類などの天敵であるキツネの排泄物に由来する化合物で、先天的な恐怖情動を誘導する物質である 2,4,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT)の化学構造を最適化し、2-methyl-2-thiazoline (2MT)などの、人工物に由来する匂い分子群である Thiazoline-related fear odor: tFO(チアゾリン類恐怖臭)を開発し、マウスに強力な先天的恐怖行動を誘導する技術を確立した。

さらに昨年度には、tFO 刺激が恐怖行動のみではなく、低体温、嫌気性代謝、および抗低酸素反応を強力に誘導し、致死的な低酸素状態での生存期間を延長したり、虚血/再灌流モデルの重症度を減少させることを発見し報告している。この発見は、先天的恐怖情動を誘導する匂い分子と危機状態での生命保護作用の結びつきを示す証拠となる。私たちは、ここで明らかになった、先天的な恐怖情動システムに感覚刺激を利用して介入することで潜在的な保護作用を誘導する技術体系を「感覚創薬」と名づけた。tFO 刺激が誘導する多様な生理的反応を担う受容体遺伝子を同定することは、感覚創薬技術をヒトの医療に応用できるかどうかを評価する上でも重要である。

これまでの私たちの研究により、tFO の知覚におけるいくつかの候補となる受容体遺伝子や神経経路が同定されている。背側嗅覚経路とその匂い受容体は、TMT や警報フェロモンである 2-sec-butyl-2-thiazoline (SBT) によって引き起こされる回避行動や恐怖関連行動を制御する。一方、私たちはフォワードジェネティックスクリーニングにより、2MT や TMT などの tFO によってマウスに誘導されるすくみ行動や回避行動が、三叉神経細胞の transient receptor potential ankyrin 1 (Trpa1) 遺伝子によって制御されていることも解明した。さらに、Trpa1 ノックアウトマウスでは、チアゾリン類匂い分子を含まない天然物、例えばヘビ由来の化合物に対する恐怖関連行動も抑制されることが明らかになっている。このように、tFO に対する恐怖関連行動は、少なくとも 2 つの異なるシステムによって制御されていると考えられる。(1)三叉神経系に存在する Trpa1、(2)嗅覚系に存在する嗅覚受容体(Odorant receptor:

OR)。しかし、tFO が誘導する生理応答や保護作用の原因となる遺伝子や神経経路は不明である。私たちは、これらの作用の制御における Trpa1 遺伝子の寄与を明らかにすることを目的とした研究を行なった。

TRPA1 は、当初、低温活性化イオンチャンネルとして同定された。TRPA1 は、からし油やわさびの辛味成分であるアリルイソチオシアネート (AITC) や侵害刺激であるホルマリンなどの外因性刺激や、炎症によって発生する 4-hydroxy-2-nonenal や H₂O₂ などの内因性刺激などでも活性化される。さらに、Trpa1 遺伝子は、炎症性疼痛や炎症後の知覚過敏、異常な酸素濃度の知覚、軽度低酸素に対する呼吸応答の調節に関与していることが知られる。これらの結果などから、Trpa1 遺伝子は複数のシグナルを感知して痛みや危険の情報を脳に伝えるアラームセンサーと考えられている。これらの知見を発展させ、私たちは Trpa1 遺伝子が危機状態を感知する警戒センサーとして機能するのみではなく、危機状態での生存確率を上昇させる保護作用の誘導も担う、即ち、tFO を介した潜在的な保護作用の誘導にも重要な役割を果たし、致死的な状況下での生存率を高めていると仮定した。

この仮説に基づいた様々な実験を実施した結果、三叉神経と迷走神経に存在する TRPA1 が tFO を感知し、この情報は脊髄三叉神経路 (Sp5) と孤束路核 (NTS) に伝達され、低体温、低酸素代謝、致死的低酸素状態での生存率を調節していることを解明した。さらに、TRPA1 と Sp5/NTS の活性化をモニターすることで、低酸素状態での生存期間を既知の tFO の さらに 10 倍に延長できる新たな匂い分子も同定した。これらの結果から、Trpa1 遺伝子が危険センサーとして機能するだけでなく、自然恐怖に関連した生理的反応の誘導を指令し、さらには致死的な低酸素状態での生存能力の獲得に関与していることが明らかになった。

<List of Publication>

【原著論文】

1. Matsuo T, Isosaka T, Hayashi Y, Tang L, 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. (2021) Thiazoline-related innate fear stimuli orchestrate hypothermia ad anti-hypoxia via sensory TRPA1 activation. *Nat Commun.* 12: 2074
2. Liu C, Lee CY, Asher G, Cao L, Terakoshi Y, Cao P, Kobayakawa R, Kobayakawa K, Sakurai K, Liu Q. (2021) Posterior subthalamic nucleus (PSTh) mediates innate fear-associated hypothermia in mice. *Nat Commun.* 12: 2648.
3. Nishi M, Ogata T, Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsuo T, Cannistraci CV, Tomita S, Taminishi S, Suga T, Kitani T, Higuchi Y, Sakamoto A, Tsuji Y, Soga T, Matoba S. (2021)

Energy-sparing by 2-methyl-2-thiazoline protects heart from ischaemia/reperfusion injury. *ESC Heart Fail.* 9(1): 428-441.

4. Yoko Hayashi-Takanaka, Yuichiro Hayashi, Yasuhiro Hirano, Atsuko Miyawaki-Kuwakado, Yasuyuki Ohkawa, Chikashi Obuse, Hiroshi Kimura, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka. (2021) Chromatin loading of MCM hexamers is associated with di-/tri-methylation of histone H4K20 toward S phase entry. *Nucleic Acids Res.* 49(21): 12152-12166

【総説】

1. 小早川高
「先天的恐怖臭による人工冬眠・生命保護作用の発見」
Clinical Neuroscience Vol.39 No.2 p171-175 (2021-2)

【国際学会】

口頭発表

1. Ko Kobayakawa “Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related innate fear odors via sensory TRPA1 activation”
第44回日本神経科学大会、2021年7月30日
2. Tomohiko Matsuo, Tomoko Isosaka, Reiko Kobayakawa, Ko Kobayakawa
“Molecular and neural mechanism of life-protective effects induced by thiazoline-related innate fear odors in mice”
第44回日本神経科学大会/CJK 第1回国際会議 神戸 2021年7月28-31日

【国内学会】

1. 小早川 高
「匂い分子による人工冬眠・生命保護状態の誘導」
低酸素研究会 2021(2021年9月4日、WEB開催)
2. Ko Kobayakawa
“Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related innate fear odors”
日本味と匂学会第55回大会(2021年9月22~24日、福岡・WEB開催)
3. 小早川 令子
「先天的恐怖臭が誘導する人工冬眠・生命保護作用」
第74回日本自律神経学会総会(2021年10月23日WEB開催)

【ポスター発表】

1. Yuichiro Hayashi, Constrained NMF-based extraction method of calcium activity from wide-field volumetric imaging data、第44回日本神経科学大会、2021年7月31日、神戸

○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、修士課程大学院生 1 名、研究員 3 名に研究医養成コース学生 1 名、加えて、産科学・婦人科学講座、外科学講座、眼科学講座との共同研究を推進している。

以下に今年度の主要な研究成果について記述する。

I. 酸素生物学

1. ポリサルファイド (H_2Sn) 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。 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だし、その成果を原著論文として公刊した。

2. 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的障害の発生に寄与する主要な要因である。ヒトの子宮内膜に及ぼす喫煙の影響について低酸素誘導因子 (HIF) -1 α 活性化の制御機構を検討した。ヒト初代子宮内膜間質細胞と不死化細胞株 (KC02-44D) において、CS 抽出物 (CSE) は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、また網羅的遺伝子発現解析により CSE が 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。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、研究成果を原著論文として公刊した。

3. SARS-CoV-2 受容体の発現制御機構

広島大学との共同研究の成果として、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の宿主受容体

であるアンギオテンシン転換酵素 2 (ACE2)の発現抑制経路、およびその制御に関わる化合物を同定し論文を公刊した。タバコ煙抽出物 (CSE)による細胞内シグナルの解析過程で、CSE が芳香族炭化水素受容体 (AHR)の活性化を介して ACE2 の発現を抑制することを見いだした。さらに AHR を活性化するトリプトファン代謝物やプロトンポンプ阻害剤についても、同様の ACE2 発現抑制活性を持つことを示し、細胞感染モデルにおいてこれらの化合物が細胞へのウイルス感染を阻害することを明らかにした。本成果は既存薬を使用することによる安全性の担保、ウイルスの変異による影響を受けにくい点などウイルス感染症治療におけるアドバンテージを有しており、プレスリリース後の新聞取材等大きな反響を得た。

II. クリニカルシーケンシング

1. ポータブルシーケンサーを用いた迅速微生物同定技術の開発

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。

遺伝子増幅およびシーケンシングライブラリ調製法を改良し、ナノポアシーケンシングのための簡便なプロトコルを確立した。本手法を用いた迅速な細菌同定法、およびデータ解析の手法について執筆を担当した書籍が出版された。

2. 感染症診断・細菌叢解析

腸内細菌叢解析において、シーケンス領域や解析に用いるデータベースの違いが菌種の同定精度に及ぼす影響について詳細に解析を行った論文が公刊された。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、ナノポアシーケンサーを用いたロングリード解析に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。

さらに他の診療課との共同研究の成果として、腔内細菌叢の解析手法の確立に関する論文を公刊した。また眼科領域における感染症の迅速診断に関する論文を投稿した。

3. ナノポアシーケンシングによる簡便な遺伝子多型判別法の開発

周術期使用薬剤に対する感受性や術後予後との関連が知られる一塩基多型 (SNP)について、ナノポアシーケンサーによる遺伝子型判別法を開発した。6 個の標的 SNP について、唾液より採取したヒトゲノム DNA より多型を含む領域を増幅し、ナノポアシーケンサーを用いて配列データを取得した。バイオインフォマティクスツールを用い

て該当する SNP の遺伝子型を判別するパイプラインを構築した。実験は研究医養成コースの学部学生が担当し、その成果は原著論文として英文査読誌に掲載された。

III. 新型コロナウイルス感染症への取り組み

2020 年初頭からパンデミックとなった新型コロナウイルス感染症は現在でも医療上の大きな問題であり続けている。本部門でもこの問題への取り組みを継続してきた。この間、基礎的な研究成果に加えていくつかの総説を発表した。

<List of Publication >

① 論文・総説

1. Taniguchi H, Matsuo Y, Shimoi K, Yoshimura M, Hirota K, Kinoshita H. Establishment of A Novel Assessment of the Quality of Human Spermatozoa measuring Mitochondrial Oxygen Metabolism. *BMC Res Notes*. 2022 (in press)
2. Komiya S, Matsuo Y, Nakagawa S, Morimoto Y, Kryukov K, Okada H, Hirota K. MinION™, a portable long-read sequencer, enables rapid vaginal microbiota analysis in a clinical setting. *BMC Med Genomics*. 2022 (in press)
3. Tabata Y, Matsuo Y, Fujii Y, Ohta A, Hirota K. Rapid detection of single nucleotide polymorphisms using the MinION nanopore sequencer: a feasibility study for perioperative precision medicine. *JA Clin Rep*. 2022 Mar 4;8(1):17.
4. Hashimoto D, Sato S, Ishikawa H, Kodera Y, Kamei K, Hirano S, Fujii T, Uemura K, Tsuchida A, Yamada S, Yamamoto T, Hirota K, Sekimoto M. Efficacy of active hexose correlated compound on survival of patients with resectable/borderline resectable pancreatic cancer: a study protocol for a double-blind randomized phase II study. *Trials*. 2022 Feb 12;23(1):135.
5. Hirota K, Mayahara T, Fujii Y, Nishi K. Asymptomatic Hypoxemia as a Characteristic Symptom of Coronavirus Disease: A Narrative Review of Its Pathophysiology. *COVID*. 2022 Jan 5;2(1):47-59.
6. Matsuo Y. Introducing Thioredoxin-Related Transmembrane Proteins: Emerging Roles of Human TMX and Clinical Implications. *Antioxid Redox Signal*. 2021 Dec 7. doi: 10.1089/ars.2021.0187. Epub ahead of print.
7. Hirota K. Special Issue: Hypoxia-Inducible Factors: Regulation and Therapeutic Potential. *Biomedicines*. 2021 Nov 25;9(12):1768.
8. Tanimoto K, Hirota K, Fukazawa T, Matsuo Y, Nomura T, Tanuza N, Hirohashi N, Bono H, Sakaguchi T. Inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro by suppressing its receptor, angiotensin-converting enzyme 2, via aryl-hydrocarbon receptor signal. *Sci Rep*. 2021 Aug 17;11(1):16629.
9. Uba T, Matsuo Y, Sumi C, Shoji T, Nishi K, Kusunoki M, Harada H, Kimura H, Bono H, Hirota K. Polysulfide inhibits hypoxia-elicited hypoxia-inducible factor activation in a mitochondria-dependent manner. *Mitochondrion*. 2021 Jul;59:255-266.
10. Hirota K. Hypoxia-dependent signaling in perioperative and critical care medicine. *J Anesth*. 2021 Oct;35(5):741-756.
11. Hirota K. HIF- α Prolyl Hydroxylase Inhibitors and Their Implications for Biomedicine: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2021 Apr 24;9(5):468.
12. Sakai T, Matsuo Y, Okuda K, Hirota K, Tsuji M, Hirayama T, Nagasawa H. Development of antitumor biguanides targeting energy metabolism and stress responses in the tumor microenvironment. *Sci Rep*. 2021 Mar 1;11(1):4852.

13. Fujii Y, Daijo H, Hirota K. Estimation of the Number of General Anesthesia Cases Based on a Series of Nationwide Surveys on Twitter during COVID-19 Pandemic in Japan: A Statistical Analysis. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Feb 8;57(2):153.
14. Matsuo Y, Komiya S, Yasumizu Y, Yasuoka Y, Mizushima K, Takagi T, Kryukov K, Fukuda A, Morimoto Y, Naito Y, Okada H, Bono H, Nakagawa S, Hirota K. Full-length 16S rRNA gene amplicon analysis of human gut microbiota using MinION™ nanopore sequencing confers species-level resolution. *BMC Microbiol*. 2021 Jan 26;21(1):35.
15. Kida N, Matsuo Y, Hashimoto Y, Nishi K, Tsuzuki-Nakao T, Bono H, Maruyama T, Hirota K, Okada H. Cigarette Smoke Extract Activates Hypoxia-Inducible Factors in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner in Stroma Cells from Human Endometrium. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Jan 3;10(1):48.
16. 広田喜一 虚血・阻血による臓器障害メカニズムと耐性獲得戦略 *Life Support and Anesthesia 2021 別冊'21(秋)*,7-13.

② 学会発表

なし

③ 著書

1. Kirill Kryukov, 中川草, 松尾禎之, 廣田喜一, 今西規 *GenomeSync+GSTK 法 実験医学別冊「メタゲノムデータ解析」* 羊土社 2021年11月30日 pp. 98-109.
2. 松尾禎之 *ナノポア技術によるオンサイト迅速細菌同定 実験医学別冊「最強のステップUP シリーズ ロングリード WET&DRY 解析ガイド」* 羊土社 2021年9月17日 pp. 213-219.

○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、ミオクロームスアテクトシス、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。

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 379 万件、データダウンロード数 7,700 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

一昨年度、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、中核病院としての認可を得るために、運用体制の整備だけでなく、診断実績の蓄積およびがん研究を推進する活動を行っている。

- 腎癌の中でも75%を占める淡明細胞型腎細胞癌の病理組織像について、核異型度

が高いがん細胞における細胞質の色調の差に着目し、1) 細胞質の好酸性変化に基づく新たな組織表現型分類（淡明型、混合型、好酸性型）を確立し、2) それぞれの表現型と低酸素誘導・血管新生や腫瘍微小環境など、淡明細胞型腎細胞癌に関わる詳細な遺伝子発現の解析を行った。その結果、今回構築した新たな分類が転移性淡明細胞型腎細胞癌における血管新生阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬の治療効果、及び予後予測に繋がることが明らかとなった。今後、新たに構築した分類をさらに外部検証することで、煩雑で高価な遺伝子検査に依存しない、再現性の高い組織学的なバイオマーカーとしての確立が期待される。

<プレスリリース>

2021.10.22【関西医科大学】淡明細胞型腎細胞癌の形態を解明、新分類法確立

https://www.kmu.ac.jp/news/laaes7000000hz09-att/20211022Press_Release.pdf

VII. 環境適応に寄与する遺伝形質の探索

異なる時間スケールに基づいて、低圧低酸素環境への適応・順応に寄与する遺伝因子の同定やその分子進化の解明を目指している。長期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、南米アンデス高地集団（ボリビア共和国：標高 3500m～4000m）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おこなっている。これまでに、ヘモグロビン濃度と関連を示すアンデス高地集団特異的な遺伝形質の存在を見出している。また、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に着目して、その機能的潜在性の遺伝要因に関する研究に取り組んでいる。特に、短期・中期的な低圧低酸素応答に関連する遺伝因子および分子機構の解明を目指し、エピジェネティクスの観点から研究を推進しているところである。人工気候制御室にて標高 3500m 相当まで気圧を下げ、急性の低圧低酸素曝露した日本人被験者のトランスクリプトーム解析から、曝露後の発現変動遺伝子群を同定している。

VIII. マラリア原虫の薬剤耐性メカニズムに関する研究

2022年12月から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、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。

英文原著

1. Ohe C, Yoshida T, Amin MB, Atsumi N, Ikeda J, Saiga K, Noda Y, **Yasukochi Y**, Ohashi R, Ohsugi H, **Higasa K**, 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*. 2022 *in press*
2. Saiga K, Ohe C, Yoshida T, Ohsugi H, Ikeda J, Atsumi N, Noda Y, **Yasukochi Y**, **Higasa K**, 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.
3. 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.
4. Kitamura S, Yamaguchi K, Murakami R, Furutake Y, **Higasa K**, Abiko K, Hamanishi J, Baba T, Matsumura N, Mandai M. PDK2 leads to cisplatin resistance through suppression of mitochondrial function in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci*. 112:4627-4640, 2021.
5. **Yasukochi Y**, Shin S, Wakabayashi H, Maeda T. Upregulation of cathepsin L gene under mild cold conditions in young Japanese male adults. *J Physiol Anthropol*. 40(1), 16, 2021.
6. Yoshida T, Ohe C, Ikeda J, Atsumi N, Ohsugi H, Sugi M, **Higasa K**, Saito R, Tsuta K, Matsuda T, Kinoshita H. Eosinophilic features in clear cell renal cell carcinoma correlate with outcomes of immune checkpoint and angiogenesis blockade. *J Immunother Cancer*. 9(9):e002922, 2021.
7. Sato Y, Tsukaguchi H, **Higasa K**, Kawata N, Inui K, Linh TNT, Quynh TTH, Yoshihiko I, Koiwa F, Yoshimura A. Positive renal familial history in IgA nephropathy is associated with worse renal outcomes: a single-center longitudinal study. *BMC Nephrol*. 22(1):230, 2021.

8. Mizuno F, Gojobori J, Kumagai M, Baba H, Taniguchi Y, Kondo O, Matsushita M, Matsushita T, Matsuda F, **Higasa K**, Hayashi M, Wang L, Kurosaki K, Ueda S. Population dynamics in the Japanese Archipelago since the Pleistocene revealed by the complete mitochondrial genome sequences. *Sci Rep.* 11(1):12018, 2021.
9. 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.* 66(6):557-567, 2021.
10. Mizobuchi K, Hayashi T, Oishi N, Kubota D, Kameya S, **Higasa K**, Futami T, Kondo H, Hosono K, Kurata K, Hotta Y, Yoshitake K, Iwata T, Matsuura T, Nakano T. Genotype-Phenotype Correlations in RP1-Associated Retinal Dystrophies: A Multi-Center Cohort Study in JAPAN. *J. Clin. Med.* 10(11), 2265, 2021.
11. Kanda S, Fujii Y, Hori S, Ohmachi T, Yoshimura K, **Higasa K**, Kaneko K. Combined Single Nucleotide Variants of ORAI1 and BLK in a Child with Refractory Kawasaki Disease. *Children* 8 (6), 433, 2021.
12. Matsuo T, Isosaka T, Hayashi Y, Tang L, 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 Commun.* 6;12(1):2074, 2021.
13. **Yasukochi Y**, Nishimura T, Ugarte J, Ohnishi M, Nishihara M, Alvarez G, Fukuda H, Mendoza V, Aoyagi K. Effect of *EGLN1* genetic polymorphisms on hemoglobin concentration in Andean highlanders. *BioMed Res Int.* 3436581, 2020.
14. Nishimura T, Ugarte J, Ohnishi M, Nishihara M, Alvarez G, **Yasukochi Y**, Fukuda H, Arima K, Watanuki S, Mendoza V, Aoyagi K. Individual variations and sex differences in hemodynamics with percutaneous arterial oxygen saturation (SpO₂) in young Andean highlanders in Bolivia. *J Physiol Anthropol.* 39(1), 31, 2020.

15. Fukuda H, Ugarte J, Nishimura T, **Yasukochi Y**, Onishi M, Nishihara M, Aoyagi K, Saito T. Toothache experience among Japanese and Bolivian dental school students. The Journal of Japan Dental Society of Oriental Medicine. 39(1-2), 1-5, 2020.
16. Shin S, **Yasukochi Y**, Wakabayashi H, Maeda T. Effects of acute hypobaric hypoxia on thermoregulatory and circulatory responses during cold air exposure. J Physiol Anthropol. 39(1), 28, 2020.
17. **Yasukochi Y**, Shin S, Wakabayashi H, Maeda T. Transcriptomic changes in young Japanese males after exposure to acute hypobaric hypoxia. Front Genet. 11, 559074, 2020.
18. Komatsu T, Shimizu T, Kanoh M, Miyakawa T, Satta Y, **Yasukochi Y**, Fujimoto R, Tada M, Machida K, Kataoka S, Udaka K. Development of a novel monoclonal antibody that binds to most HLA-A allomorphs in a conformation-dependent yet peptide-promiscuous fashion. Immunogenetics. 72(3), 143-153, 2020.

学会発表

1. 佐藤燦斗、大橋路弘、江藤太亮、西村貴孝、安河内彦輝、中山一大、太田博樹、樋口重和　メラトニン受容体遺伝子近傍の一塩基多型が模擬的夜勤による概日リズムの位相後退に及ぼす影響　第 28 回日本時間生物学会　2021 年 11 月 20 日
2. 安河内彦輝　ゲノムから評価するコロナ禍における生活習慣病発症リスク　第 82 回日本生理人類学会　2021 年 10 月 31 日
3. 佐藤燦斗、大橋路弘、江藤太亮、西村貴孝、安河内彦輝、中山一大、太田博樹、樋口重和　一晩の模擬的夜勤による耐糖能への影響：メラトニン受容体遺伝子多型に着目した個人差　第 82 回日本生理人類学会　2021 年 10 月 30 日
4. 福井充香、日笠幸一郎、竹谷茂、光井俊人、松岡祐貴、日原正勝、孫仲鑫、覚道奈津子　陰圧が血管内皮細胞（HUVEC）に与える影響：次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現の網羅的解析　第 30 回日本形成外科学会基礎学術集会　2021 年 10 月 7 日

5. Yoshioka W, Sonehara K, Iida A, Oya Y, Kurashige T, Okubo M, Ogawa M, Matsuda F, **Higasa K**, Mori-Yoshimura M, Nakamura H, Hayashi S, Okada Y, Noguchi S, Nishino I. GNE pathogenic variant p.D207V rarely develops myopathy in homozygote World Muscle Society 2021.09.23
6. 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 2021.08.27
7. **Yasukochi Y**, Nishimura T, Ohnishi M, Nishihara M, Ugarute J, Fukuda H, Aoyagi K. Effects of *EGLNI* haplotypes on hemoglobin concentration in Andean highlanders. Annual Meetings of the Society for Molecular Biology 2021.07.03.
8. **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 全ゲノム解析による南米ポリビア集団の高地適応遺伝子の探索 第 41 回日本登山医学会 2021 年 5 月 30 日
9. 溝渕圭、林孝彰、林孝彰、大石典子、亀谷修平、**日笠幸一郎**、二見拓磨、近藤寛之、細野克博、倉田健太郎、堀田喜裕、吉武和敏、岩田岳、中野匡 日本人における RP1 関連網膜症の遺伝的、臨床的特徴について 第 125 回日本眼科学会 2021 年 4 月 8 日
10. **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 アンデス高地集団の *EGLNI* ハプロタイプがヘモグロビン濃度を与える影響 第 92 回日本遺伝学会 2020 年 9 月 16 日

著書

1. **安河内彦輝** 新編 生理人類学入門－遺伝の基礎 国際文献社 2022 年 2 月 15 日
2. **日笠幸一郎** 一般集団・多因子疾患関連バリエーションのデータベース Human Genetic Variation Database (HGVD) 遺伝子医学 39 号 2022 年 1 月 1 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。

最初に樹立した t-flippase 欠損マウスに関しては、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 11.4Kb deletion したマウスを新たに樹立し、表現型解析を行った。しかしながら、今回樹立した欠損マウスは、いずれも正常な精子形成を示し、妊孕性を持つことが明らかとなった。今後は、精巣だけでなく卵巣で特異的な発現を示す遺伝子にも着目し、その機能解析を進めることにより、受精の分子メカニズムの解明を行う。

HASPIN 阻害剤 CHR-6494 の乳がん細胞株への増殖抑制効果の評価

セリン・スレオニンキナーゼである HASPIN は H3 をリン酸化することで、有糸分裂を制御する。様々な癌において、HASPIN 発現量の上昇は腫瘍の悪性度や生存率の低さと逆相関している。乳癌では、隣接する正常組織と比較して、癌組織で HASPIN 発現量の上昇が認められた。このことから、HASPIN の機能阻害は乳癌の増殖を抑制する可能性が示唆される。しかし、乳癌細胞株を用いた機能解析は 1 つの細胞株で報告があるのみで、他のサブタイプに関しては未解析であった。そこで、強力な HASPIN 阻害剤である CHR-6494 の増殖抑制効果を複数の乳がん細胞株を用いて *in vitro* および *in vivo* で検討した。我々は、HASPIN がすべての分子サブタイプの乳癌細胞、および不死化乳腺上皮細胞で発現していることを見いだした。また、HASPIN の発現量は、乳癌の分子サブタイプよりも、細胞増殖率と相関することを示した。CHR-6494 は乳がん細胞株と不死化乳腺上皮細胞に対して *in vitro* で抗増殖効果を示したが、

MDA-MB-231 異種移植実験では、腫瘍の成長を阻害することはできなかった。これらの結果は、CHR-6494 が特定の条件下で抗増殖効果を発揮することを示唆しており、乳がん患者の抗がん剤として使用するためには、より強力で選択的な HASPIN 阻害剤を同定するための薬剤スクリーニングが必要である。

【論文・総説等】

1. **Nishida-Fukuda H**, **Tokuhiro K**, Ando Y, Matsushita H, Wada M, Tanaka H. Evaluation of the antiproliferative effects of the HASPIN inhibitor CHR-6494 in breast cancer cell lines. *PLoS One*. 16(4):e0249912. 2021.
2. Oyama Y, Miyata H, Shimada K, Fujihara Y, **Tokuhiro K**, Garcia TX, Matzuk MM, Ikawa M. CRISPR/Cas9-mediated genome editing reveals 12 testis-enriched genes dispensable for male fertility in mice. *Asian J Androl*. doi: 10.4103/aja.aja_63_21. Online ahead of print. 2021.

【主な学会発表】

1. 大山 裕貴、宮田 治彦、嶋田 圭祐、藤原 祥高、**徳弘 圭造**、Garcia Thomas、Matzuk Martin、伊川 正人「精巣で発現する 12 遺伝子はマウス雄性生殖能力に必須ではない」日本アンドロロジー学会 第 40 回学術大会 2021 年

○細胞機能部門

<研究概要>

海馬記憶神経回路・海馬神経細胞の研究と新技術開発

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。

近年、「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、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。2021 年度においては、「BATTLE」技術を用いて、マウス海馬における新たな「細胞」「神経回路」の探索を行い、そして「BATTLE」技術の改良・発展を行なった。

また産学連携活動としては、Nikon ソリューションズ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。

脳腫瘍の治療薬の開発

希少がん、かつ難治性がんである膠芽腫は生存期間が 15 か月であり、根治療法はない。膠芽腫は脳の正常部位に浸潤するため、外科手術での全摘出は難しい。膠芽腫に対する唯一の既存薬である、テモゾロミドの有効性は十分ではなく、新たな化学療法剤の開発が望まれている。がんの発生かつ治療抵抗性の根源として、がん幹細胞の存在が提唱されている。そのため、がん幹細胞をターゲットとした治療法の開発が世界中で行われている。

我々は、手術で摘出された膠芽腫の組織から、がん幹細胞を樹立した。そして、それらのがん幹細胞がムコリピンを発現していることを見いだした。正常の細胞において、ムコリピンは細胞内のエンドソームに分布する。しかし、我々は電気生理学および免疫組織学的手法を用いて、ムコリピンが、がん幹細胞の細胞膜に局在することを明らかにした。細胞膜に分布するムコリピンは、Na イオンを細胞内に流入させる。Na イオンは水の浸透流を引き起こすため、細胞容積が増加する。細胞容積は細胞の増殖や遊走に関わるため、ムコリピンはがん幹細胞の機能に重要な意義をもつと考えられる。実際、ムコリピンの抑制薬はがん幹細胞を死滅させた。さらに、膠芽腫モデルマウスにムコリピンの抑制薬を 5 日間連続で経口投与すると、全生存期間が延長した。

以上の成果を踏まえて、ムコリピンの抑制薬とムコリピンチャネルとのドッキングを機械学習させたインシリコ・スクリーニングにより、既存薬より有効性が高い新規化合物を創出した（特願 2021-055869）。現在、膠芽腫のオーファンドラッグの開発を目指し、新規化合物の単剤経口療法の非臨床薬効薬理試験を実施している。

幼弱海馬における代謝型グルタミン酸受容体機能の解明

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)にはI~III型があり、これはさらに8つのサブタイプに分類され、それぞれ異なる機能と組織局在を示す。このうち $G_{q/11}$ 蛋白と共役するのはI型で、mGluR1 と mGluR5 のサブタイプが属する。神経細胞興奮調節やシナプス可塑性などへの関与が指摘されている。I型の普遍的な性質には細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出があるが、NMDA 受容体電流の増強・電位依存性 Ca^{2+} チャネルや TRP チャネルの開口・ K^+ チャネルの抑制等の性質については発現する組織に依存する。大脳皮質・海馬辺縁帯のカハール・レチウス細胞（CR 細胞）は、糖蛋白リーリン（reelin）の分泌を通じて皮質層構造の形成に寄与するほか、興奮性の入力を海馬の他の細胞に送っており、海馬ネットワークの一部としても働いていることが推測されている。

これまでの研究で、免疫組織化学的に存在が指摘されていた海馬 CR 細胞の mGluR1 が実際に細胞内のカルシウムを動員することを、蛍光イメージングによって示した。一方で mGluR5 による細胞内カルシウム濃度上昇はみられなかった。CR 細胞における mGluR1 の機能を明らかにするため、さらに他受容体・チャネルとの相互作用および、細胞の興奮性や海馬神経ネットワークに与える影響について検討した。mGluR1 刺激による細胞内カルシウム上昇は、 $GABA_B$ 受容体アゴニストまたはアンタゴニストの投与により変化せず、小脳で報告されている両受容体間のクロストークは CR 細胞では存在しないことが示唆された。パッチクランプ法による膜電流測定では mGluR1 刺激による膜電流の変化はほとんどなく、この系においては mGluR1 が直接他チャネルを開閉して細胞興奮性を変化させている可能性は低いと考えられた。

現在 $GABA_B$ 受容体以外の受容体・チャネルとの相互作用の有無についての検討を行っている。

<List of Publication>

①論文・総説等

1. Maruyama M, Nakano Y, Nishimura T, Iwata R, Matsuda S, Hayashi M, Nakai Y, Nonaka M, Sugimoto T., PC3-secreted microprotein is expressed in glioblastoma stem-like cells and human glioma tissues. Biological & pharmaceutical bulletin, 2021 Jul 1;44(7): 910–919
2. Matsuo T, Isosaka T, Hayashi Y, Tang L, 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.,
Nature communications 2021 Apr 6; 12(1): 2074

3. Inoue, A., Kobayashi, T., Hirai, H., Kanaya, N. and Kohara, K. Protocol for BATTLE-1EX: A High-Resolution Imaging Method to Visualize Whole Synaptic Structures and their Components in the Nervous Systems, STAR Protocols, 2020 Nov 25;1(3):100166.

②主要な学会発表

1. 武藤恵、幼若海馬における I 型代謝型グルタミン酸受容体の機能 第 99 回日本生理学会大会 2022 年
2. 林美樹夫、Hoque Kazi Mirajul、コレラ菌副毒素は腸管上皮細胞の KCNQ 型 K チャンネルを活性化する 第 99 回日本生理学会大会 2022 年

③著書

1. 小原圭吾 神経栄養因子 脳科学辞典（オンライン）DOI : 10.14931/bsd.9363 (2020)

○総合研究施設

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、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 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	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
	令和 3 年度～	人見浩史 六車恵子
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 29 年度～平成 30 年度	松村伸二 神田晃
	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
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29～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、3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3年度は決算見込み

		平成29年度	平成30年度	令和元年度	令和2年度	令和3年度
運営費	消耗品費	8,742,710	8,383,958	13,593,724	14,998,164	14,500,000
	修繕費	7,713,122	13,351,671	8,130,087	10,826,230	7,500,000
	業務委託費	3,117,413	3,999,528	6,058,820	5,764,550	6,200,000
	その他支出	1,604	1,080	2,160	0	0
	戻入金	-7,775,585	-8,323,967	-9,646,473	-10,231,824	-7,000,000
	小計	11,799,264	17,412,270	18,138,318	21,357,120	21,200,000
機器備品費		9,233,352	3,628,476	8,648,686	10,829,760	9,670,000
執行額合計		21,032,616	21,040,746	26,787,004	32,186,880	30,870,000

機器設備の整備

令和4年3月20日現在

	設備名/機器名		システム総額	綜研負担額
平成29年度	クロマトチャンバー MC-20EF3	綜研機器備品費		736,560
	マイクロフォージ MF-900	綜研機器備品費		496,800
	フローサイトメーター Attune NxT AF Cytometer Blue/Red Lasers	綜研機器備品費		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	綜研機器備品費		820,800
	オートクレーブ	綜研機器備品費		504,900
	超低温層	綜研機器備品費		655,560
	CO ₂ インキュベーター	綜研機器備品費		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	ケミルミイメージングシステム 一式	綜研機器備品費		3,102,880
	万能核酸精製装置	綜研機器備品費		2,156,000
	バイオハザードセイフティキャビネット	綜研機器備品費		1,219,536
	スライドレスセルカウンター	綜研機器備品費		988,900
	MSシステムLegacyパッケージ 一式	綜研機器備品費		874,800
令和2年度	CT画像解析用PC	綜研機器備品費		306,570
	スイングローター P40ST	綜研機器備品費		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
令和3年度	単一細胞解析システム	R3年度文科省2/3助成	7,425,000	2,475,000
	細胞・組織ピッキング装置 Unipick+ (ブリッジ付)			
	IMARIS upgrade	綜研機器備品費		3,707,000
	高速冷却遠心機 Avanti JXN-30	綜研機器備品費		年度内納品予定

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ケンサー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。次世代シーケンサーについては、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OUNTER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 を行った。年度内に高機能高速冷却遠心機を更新予定である。

綜研利用登録者数の変遷と主な装置の使用状況

令和4年3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	令和3年度
登録者数	347	333	386	395	402	389
登録者中大学院生 (博士課程・修士課程)	93	75	65	68	70	77
登録者中学部学生 (医学部・リハ学部・看護学部)	---	---	22	29	38	25

--- データなし

令和 3 年度は装置の誤操作などの大きな事故はなく、ユーザーの使用方法は改善されている。

主な装置について、設置場所別に過去 10 年の使用実績を別表に示した。表に

示されている以外にも総研は多数の機器を所有している。装置は経年劣化などの問題を抱えているものが多く、それらを適切な時期に更新することや維持管理にかかる経費が今後の課題である。

令和4年2月末日現在

購入年度	設備名	設置場所	2012年度～2021年度 (H24～R3) 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	373
H28	3Dプリンターシステム (EDEN260VS)	オープンラボ1	224
H27	遺伝子解析装置 (nCounter DX Analysis System-FLEX)	オープンラボ1	93
H23	MALDI-IT-TOP型顕微質量分析装置 (質量顕微鏡特型機)	質量顕微鏡室	1041
H21	トータル細胞可視化解析システム (FV1000)	多光子顕微鏡室	773
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	150
H23	HSオールインワン顕微鏡 (BZ9000)	生体分子イメージング室	1646
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	320
H23	近赤外蛍光イメージャー (Odyssey Svsytem)	生体分子イメージング室	545
R1	マルチモードプレートリーダー (EnSight)	蛍光定量イメージング室	114
H22	高速蛍光イメージシステム (AF6500)	光学顕微鏡室	933
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	1840
H15	生体内分子機構造画像解析システム (LSM510-META)	光学顕微鏡室	3014
H25	共焦点顕微鏡 (LSM700)	光学顕微鏡室	3691
R2	倒立型リサーチ顕微鏡システム (Dragonfly)	光学顕微鏡室	310
H18	細胞微細胞透過解析システム (JEM-1200A)	電顕室	324
H20	高性能高速冷却遠心機 (Avanti HP-301)	生化学実験室1	919
H21	マルチラベルプレートリーダー (EnSpire)	生化学実験室1	2729
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	208
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	44087 (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	97
H24	リアルタイムPCR (RotorGeneQ)	生化学実験室2	2181
H21	リアルタイムPCR (RotorGeneQ HRM)	生化学実験室2	2789
H30	次世代シーケンサー (MiSeq system)	生化学実験室2	13
R1	ケミルミイメージングシステム (FUSION solo S)	生化学実験室2	1053
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
H29	フローサイトメーター (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	326
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ッ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	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

○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。アイソトープ実験施設の管理及び運営は RI に関する法令、予防規程およびアイソトープ実験施設運営規則に基づいて実施している。

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要因である。その解析の手法としての分子イメージングがあげられ、Tracer に蛍光試薬ではなく RI を利用するものである。

平成26年には SPECT/CT が導入され、核医学治療、分子イメージング研究分野で必須な機器である。核医学治療とは分子標的薬などに RI で標識し、RI が放出する短い飛程の高エネルギー α 線や β 線を用いてがん細胞に選択的に線量を集中させることができる治療のことである。核医学治療のみならず新規薬剤の生体内分布や代謝解析などにも SPECT/CT が重要な役割を果たしている。また核医学治療研究の目覚ましい発展に伴い平成31年3月に、 α 線放出核種 At-211、Ac-225 の使用許可を本学も得る事となった。飼育室も施設内に設置されていることから α 線核種を用いた核医学治療研究において動物の観察、イメージング及び治療効果判定が学内で可能となった。

アイソトープ実験施設には X 線を利用した CT 撮影や外科用イメージング装置(透視装置)なども設置されており、小動物を対象とした核医学治療研究および分子イメージング研究の需要拡大に対応できるように施設環境を整えている。近年、放射線や RI を利用した研究分野の発展が目覚ましいことから機器の整備、法令遵守の徹底を通じて利用者の安全と信頼性の高い研究結果が提供できる環境整備が望まれている。

II.利用状況

表1に平成26年度から令和3年度における核種別使用数量を、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	令和3年度**
H-3	36	13	23	0	9	6	11	9
P-32	57	63	81	37	19	0	23	14
Y-90	27	37	0	0	74	194	0	0
I-123							464	0
I-125	11	216	252	104	86	106	149	618
I-131							760	102
Ga-67								377
Tc-99m								135

*小数点以下は四捨五入

**令和3年3月24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	令和3年度**
照射時間	3318	2448	2704	1187	1245	931	1470	1175

*小数点以下は四捨五入

**令和3年3月24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	令和3年度**
RI登録者	91	87	66	48	45	40	47	48
ガンマセル登録者	29	29	32	43	49	44	33	18

**令和3年3月24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(以下、障防法)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、障防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 RI 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、障防法が改正された。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、障防法が「放射性同位元素等の規制に係わる法律(以下、RI 規制法)」として改正された。改正の中心は特定放射性同位元素に対する防護措置であり、本学ではガンマセルに格納されている RI が防護措置の対象であるため防護規程及び下部規程を策定し原子力規制委員会へ提出し受理された。

また α 線核種の追加、ガンマセルに格納されている RI の数量変更にともなう変更許可申請を原子力規制委員会へ提出し、平成 31 年 3 月 20 日に許可証が交付された。

令和 3 年 11 月 19 日には RI 規制法に定められた原子力規制委員会の立入検査を受審し、指摘事項が 1 項目、指導事項が 3 項目という結果であった。令和 4 年 1 月 7 日に改善が完了した旨を原子力規制委員会へ報告し受理された。

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)

○実験動物飼育共同施設

<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 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 CRESTA-STEP、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 3 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 3 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。本年度は新たに光免疫学研究所の設置のため飼育室の改修を行った。

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 3 年現在・中邨智之・薬理学教授)、実験動物管理者 (令和 3 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。

令和 3 年度には公益社団法人日本実験動物学会による「動物実験に関する外部検証」を受審し、細部においてはいくつかの問題点の指摘を受けたが、「全体として、適正な動物実験の実施状況である」との高評価を得た。指摘を受けた問題点については、改善できるものは改善を行ったが、規定の改定など時間のかかるものについては現在作業を行っている。

◎ 利用状況

表 1 に平成 27～令和 2 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12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つてきている。

表1. 動物種別搬入数*

	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)	令和2年度
マウス	5153匹	5564匹	4938匹	4142匹	4950匹	4633匹
ラット	847匹	641匹	622匹	698匹	606匹	684匹
モルモット	39匹	164匹	56匹	27匹	31匹	0匹
スナネズミ	0匹	0匹	10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	40羽	23羽	51羽	61羽	41羽	51羽
サル	14頭	14頭	14頭	14頭	12頭	12頭

*：年度末の統計

表2. 利用登録研究者数*

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)	令和2年度
226名	200名	168名	253名	203名	188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）。令和2年度後半にも、また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

本年度受審した外部検証の結果をもとに、飼育環境のさらなる改善を図っていく。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。

編集後記

2021年は新型コロナウイルス感染症（COVID-19）がいまだ終息をみず、様々な活動が制限されているなか、研究レベルを落とさないように活動を維持してきました。COVID-19に関して予断は許さない状況が続いていますが、様々な活動がオンライン化され継続されるようになってきました。今後ウイズコロナの状況下、さらに研究が発展するように頑張る所存です。