

関西医科大学

病態分子イメージングセンター

平成 29（2017）年度・令和 30（2018）年度
研究成果報告書

第 4 号

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	解剖学第一講座	事業推進者名	山田 久夫
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	神経細胞および内分泌細胞のイメージング解析による機能解明		
キ ー ワ ー ド	質量顕微鏡、3次元観察、3次元電顕、3次元プリンター、免疫組織化学、核酸組織化学		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	6 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 山田久夫（教授） 研究の取りまとめ 田中進（准教授） 遺伝子発現解析・内分泌学的研究 平原幸恵（講師） 質量顕微鏡解析・ニューロステロイド研究 大江総一（助教） 動物実験（とくに安定的な終脳皮質梗塞マウス作成）・細胞生物学的研究 小池太郎（助教） 3次元観察・電顕・3次元プリンター、後根神経節研究 滝澤奈恵（大学院生） 副腎皮質再生研究			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 1）副腎皮質再生の研究： 両側副腎摘除術後のひとつの処置として摘除後の健常な部分皮質を戻し移植（自家移植）することが考えられるが、生着率の問題からほとんどおこなわれていない。そこで、ラット両側副腎を摘出し、摘出副腎から移植片を作製、右大腿二頭筋に自家移植する実験をおこなった。糖質コルチコイド産生能は、移植後 3 週目には sham 群と同等まで回復したが、鉱質コルチコイド産生能は未回復であった。内分泌機能の改善に一致して、これまで報告されていない Desert hedgehog (Dhh) のびまん性の発現上昇を移植片で認めた。本研究の結果により、副腎自家移植片の副腎皮質組織リモデリング、内分泌機能再獲得における DHH の重要性が示唆された。また、簡便・高感度・定量性を発揮する核酸組織化学法の新規改良手技を導入する取り組みもおこなった。 2）脳由来胆汁酸の研究： 中大脳動脈電気焼灼による安定的な終脳皮質梗塞をマウスに起こさせる手技を確立した。このモデルを用い、質量顕微鏡にて分析したところ、タウロコール酸（胆汁酸）が梗塞巣に認められた。胆汁酸の脳での合成を確かめるために、近接切片を用いて、1 切片を質量顕微鏡に、他の 1 切片を免疫組織化学に応用し、コレステロールからの律速酵素である CYP7A1 と合成産物である胆汁酸の共存関係から、梗塞巣にて胆汁酸が合成されていることを証明した。この事は、新たな神経内分泌因子としての胆汁酸を提唱できたことになる。また、梗塞巣に認められたことから、虚血応答因子や炎症因子との関連も学会報告した。 3）脊髄後根神経節の 3 次元解析： 組織化学法、光顕-電顕相関観察法（CLEM 法）、3次元電顕法を組み合わせ、後根神経節内のグリア細胞の 3次元形態的と組織化学的特徴を解析した。神経突起型サテライト細胞は、数十年見放されていたグリアであると既に報告したが、今回、それらがさらに 2 群にわけられることを証明した。すなわち、細胞体型サテライトグリアと髄鞘形成シュワン細胞、それぞれに近似の 2 群である。また、有髄神経線維の髄鞘起始部付近に、これまで報告のない新たなグリア細胞が存在することを発見、3次元電顕のデータをもとに 3次元プリンターで再現し（3 者の組み合わせを CLEM-3D-Printer 法という）、その立体構造の詳細を明らかにした。（日刊工業新聞への取り上げ）			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	解剖学第一講座	事業推進者名	山田 久夫
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) ※すべてレフェリー有り <u>Koike T, Tanaka S, Hirahara Y, Oe S, Kurokawa K, Maeda M, Suga M, Kataoka Y, Yamada H.</u> Morphological characteristics of p75 neurotrophin receptor-positive cells define a new type of glial cell in the rat dorsal root ganglia. J Comp Neurol, 527(12):2047-2060, 2019. <u>Oe S, Kimura T, Yamada H.</u> Regulatory non-coding RNAs in nervous system development and disease. Front Biosci, 1(24): 1203-1240, 2019. <u>Tanaka S, Honda Y, Takaku S, Koike T, Oe S, Hirahara Y, Yoshida T, Takizawa N, Takamori Y, Kurokawa K, Kodama T, Yamada H.</u> Involvement of PLAGL1/ZAC1 in hypocretin/orexin transcription. Int J Mol Med, 43(5): 2164-2176, 2019. <u>Koike T, Yamada H.</u> Methods for array tomography with correlative light and electron microscopy. Med Mol Morphol, 52(1): 8-14, 2019. Takamori Y, <u>Hirahara Y</u>, Wakabayashi T, Mori T, <u>Koike T</u>, Kataoka Y, Tamura Y, Kurebayashi S, Kurokawa K, <u>Yamada H.</u> Differential expression of nuclear lamin subtypes in the neural cells of the adult rat cerebral cortex. IBRO Reports, 5: 99-109, 2018. <u>Takizawa N, Tanaka S, Oe S, Koike T, Yoshida T, Hirahara Y, Matsuda T, Yamada H.</u> Involvement of DHH and GLI1 in adrenocortical autograft regeneration in rats. Sci Rep, 8(1): 14542, 2018. Saito K, <u>Koike T</u>, Kawashima F, Kurata H, Shibuya T, Satoh T, Hata Y, <u>Yamada H</u>, Mori T. Identification of NeuN immunopositive cells in the adult mouse subventricular zone. J Comp Neurol, 526(12): 1927-1942, 2018. <u>Koike T, Kataoka Y, Maeda M, Hasebe Y, Yamaguchi Y, Suga M, Saito A, Yamada H.</u> A Device for Ribbon Collection for Array Tomography with Scanning Electron Microscopy. Acta Histochem Cytochem, 50(5): 135-140, 2017. <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 無し <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) <u>田中進, 滝澤奈恵, 大江総一, 小池太郎, 平原幸恵, 吉田崇, 山田久夫</u> 副腎自家移植片再生への DHH の関与 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 新潟 2019 年 3 月			

平原幸恵, 若林毅俊, 小池太郎, 山田久夫

視神経損傷モデルにおける網膜の環境とリン脂質分子種の変化
第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 新潟 2019 年 3 月

大江総一, 和田早織, 平原幸恵, 小池太郎, 田中進, 山田久夫

虚血脳における CYP7A1 発現制御メカニズムの解析
第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 新潟 2019 年 3 月

和田早織, 大江総一, 平原幸恵, 齊藤育, 山田久夫

虚血脳における胆汁酸産生の解析
第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 新潟 2019 年 3 月

田中進, 小池太郎, 大江総一, 平原幸恵, 滝澤奈恵, 吉田崇, 山田久夫

腫瘍抑制因子 PLAGL1 のオレキシン転写制御への関与
第 45 回日本神経内分泌学会学術集会 東京 2018 年 10 月

小池太郎, 田中進, 平原幸恵, 大江総一, 山田久夫

後根神経節における新規グリア細胞の三次元形態
第 59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 宮崎 2018 年 9 月

小池太郎, 山田久夫

CLEM-Array tomography を用いた後根神経節内グリア細胞の観察
第 50 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 東京 2018 年 9 月

Oe S, Yamada H

CPEB1 undergoes RNA stability control by Auf1 and autologous translational repression via 3' untranslated region.

第 41 回日本神経科学大会 (Neuroscience2018) 神戸 2018 年 7 月

平原幸恵, 山田久夫

質量分析イメージング法による低分子化合物の可視化と応用
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (シンポジウム) 東京 2018 年 3 月

高森康晴, 平原幸恵, 若林毅俊, 森徹自, 小池太郎, 山田久夫

グリア細胞における核ラミナ主要成分ラミンのサブタイプ
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会 東京 2018 年 3 月

Tanaka S, Honda Y, Takizawa N, Takamori Y, Oe S, Hirahara Y, Koike T, Kodama T, Yamada H

Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response
第 40 回日本神経科学大会 (Neuroscience2017) 千葉 2017 年 7 月

<特許申請・取得状況>

無し

<マスメディアへの取り上げ>

日刊工業新聞 2019 年 3 月 13 日「関西医大、新種の細胞発見 3D プリンターで詳細観察」

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	解剖学第二講座	事業推進者名	杉本 哲夫
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	脳腫瘍進展過程のミクログリアサブタイプ解析		
キ ー ワ ー ド	腫瘍関連微小環境、P4E8 単一細胞由来クローン、ミクログリアサブタイプ		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
中野洋輔、助教、mRNA 検出、データ解析 山下雄司、大学院生、immunostaining、イメージング 丸山正人、講師、immunoblotting、イメージング、データ解析 加瀬政彦、講師、mRNA 検出 杉本哲夫、教授、構想、総括			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
脳に発生するグリオーマ（神経膠腫）は、投薬や外科的治療で腫瘍を除去しても高頻度で再発し、予後が非常に悪い。近年、グリオーマが、周辺のマクロファージあるいはミクログリアを炎症性の M1 型から抗炎症性の M2 型に分極化させることで、腫瘍の増殖に有利な微小環境（腫瘍関連マクロファージ/ミクログリア（TAM））を作り出すことが知られている。しかしながら、腫瘍形成過程における分極化の時期や、分極化が腫瘍進展に及ぼす影響の詳細については、未だに明らかにされていない。今回、マウス脳において、TAM を形成するミクログリアの形態がグリオーマ内外で大きく異なることを見出し、ミクログリアの分極化に焦点をあて実験を行った。当研究室では、これまでに、ヒトグリオーマ由来細胞株 U87MG 細胞からスフェア培養法を用いて、腫瘍形成能の高い単一細胞由来クローン（P4E8）を樹立している。そこで、P4E8 を成体ヌードマウスの脳内に投与後 5、10、15 日目の脳切片を作製し、M1 型（Iba1、CD86）及び M2 型マーカー（CX3CR1、CD206）陽性細胞の局在や細胞数を免疫染色法により解析した。その結果、経日的に CD86 陽性細胞は減少し、CD206 陽性細胞は増加した。15 日目においては腫瘍内に多数の CD206 陽性細胞が観察されたが、形態は M1 型の特徴であるアメーバ型を示した。以上より、TAM を形成するミクログリアは、グリオーマの進展に伴い、M2 型マーカーを発現するが形態は M1 型であるサブタイプに分極化することが示唆された。本研究は機能と形態上の型別を異にするサブタイプが存在することを明示しているため、今後ミクログリア分極化における新しい概念を構築する必要がある。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	解剖学第二講座	事業推進者名	杉本 哲夫
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) Iwata R, <u>Maruyama M</u>, Ito T, <u>Nakano Y</u>, Kanemura Y, Koike T, Oe S, Yoshimura K, Nonaka M, Nomura S, <u>Sugimoto T</u>, Yamada H, Asai A. Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor. Medical molecular morphology, 50(4), 211-219, 2017. [レフェリー有] Ryoichi Iwata, <u>Masato Maruyama</u>, Kohei Ofune, <u>Yousuke Nakano</u>, Souichi Oe, Mikio Hayashi, Kunikazu Yoshimura, Masahiro Nonaka, Akio Asai. The involvement of cancer stem cells in brain metastatic process. Cytometry Research, 28(1), 13-18, 2018. [レフェリー有] Muneoka S, Murayama S, <u>Nakano Y</u>, Miyata S. TLR4 in circumventricular neural stem cells is a negative regulator for thermogenic pathways in the mouse brain. J Neuroimmunol., 331, 58-73, 2019. [レフェリー有] Takagi S, Furube E, <u>Nakano Y</u>, Morita M, Miyata S. Microglia are continuously activated in the circumventricular organs of mouse brain. J Neuroimmunol., 331, 74-86, 2019. [レフェリー有] <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 該当なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は匡名と都市名)・発表年月) 岩田亮一, <u>丸山正人</u>, <u>中野洋輔</u>, 小池太郎, 大江聡一, 吉村晋一, 埜中正博, <u>杉本哲夫</u>, 山田久夫, 浅井昭雄. 転移性脳腫瘍からのがん幹細胞株樹立. 第 27 回日本サイトメトリー学会学術集会, 神戸, 2017/06. <u>山下雄司</u>, Trifonov Stefan, <u>加瀬政彦</u>, <u>丸山正人</u>, <u>中野洋輔</u>, <u>杉本哲夫</u>. マウス線条体 GPR155 の local neuron への局在. 第 40 回日本神経科学大会, 千葉, 2017/07 岩田亮一, <u>丸山正人</u>, 伊藤量基, <u>中野洋輔</u>, 小池太郎, 大江聡一, 吉村晋一, 埜中正博, 野村昌作, <u>杉本哲夫</u>, 山田久夫, 浅井昭雄. 神経内分泌腫瘍の転移脳組織からの癌幹細胞. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 岐阜, 2017/09. 岩田亮一, 大舟晃平, 伊藤量基, <u>丸山正人</u>, 大江聡一, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 埜中正博, 山田久夫, 浅井昭雄.			

グリオーマがん幹細胞で発現する ICOSLG の機能.

第 15 回がんとハイポキシア研究会, 淡路, 2017/11.

丸山正人, 中野洋輔, 岩田亮一, 西村拓也, 加瀬政彦, 杉本哲夫.

ヒト神経膠芽腫由来 U87MG 細胞から樹立した高い腫瘍形成能を持つスフェロイドは PC3-Secreted Microprotein を高発現する.

2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 第 40 回日本分子生物学会年会 第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 2017/12.

中野洋輔, 丸山正人, 加瀬政彦, 杉本哲夫.

マウス脳におけるグリオーマ進展過程のミクログリアのサブタイプ解析.

第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 武蔵野, 2018/03.

加瀬政彦, 山下雄司, 中野洋輔, 丸山正人, 杉本哲夫.

成熟ラット脳における Bcas1 遺伝子発現細胞の DiI 染色による形態的解析.

第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 武蔵野, 2018/03.

西村拓也, 丸山正人, 中野洋輔, 加瀬政彦, 杉本哲夫.

SLC24A3 遺伝子は、U87MG 細胞由来 Tumor Sphere に高発現する.

第 65 回日本生化学会近畿支部例会, 西宮, 2018/05.

中野洋輔, 丸山正人, 加瀬政彦, 杉本哲夫.

グリオーマ進展過程において、腫瘍微小環境を形成するミクログリアのサブタイプは経時的に変化する.

第 41 回日本神経科学大会, 神戸, 2018/07.

丸山正人, 中野洋輔, 岩田亮一, 西村拓也, 加瀬政彦, 杉本哲夫.

ヒトグリオブラストーマ U87MG 細胞から樹立した癌幹細胞様細胞に高発現する遺伝子の探索.

第 41 回日本神経科学大会, 神戸, 2018/07.

中野洋輔, 丸山正人, 加瀬政彦, 杉本哲夫.

マウス脳室周囲器官に局在する Toll 様受容体 4 の発現量は LPS 濃度依存的に減少する.

第 42 回日本神経科学大会, 第 62 回日本神経化学大会, 新潟, 2019/07.

加瀬政彦, 杉本哲夫.

成獣ラット脳における Bcas1 遺伝子発現細胞の細胞内 DiI 染色による形態的研究.

第 42 回日本神経科学大会, 第 62 回日本神経化学大会, 新潟, 2019/07.

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	生理学講座		事業推進者名	中村 加枝
所 属 部 門	神経部門			
分担研究課題	情動による意思決定の変化の神経メカニズムの解明			
キ ー ワ ー ド	サル、報酬、ドパミン、セロトニン、背側縫線核、視床下部、側坐核			
講座内の本プロジェクト参加研究者数			5 名	
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）				
生理学講座	教授	中村加枝	実験の遂行と解析・統括	
	同 講師	上田康雅	実験の遂行と解析	
	同 講師	安田正治	実験の遂行と解析	
	同 助教	倉岡康治	実験の遂行と解析	
	同 助教	眞田尚久	実験の遂行と解析	
研究成果の概要（平成 29 年度～30 年度の研究成果について）				
1）サル背側視床下部の報酬・嫌悪情報の表現 背側視床下部はドパミン系と解剖学的結合が強く、ドパミン細胞で観察される報酬関連反応の情報源である可能性がある。しかし、背側視床下部における報酬・さらには嫌悪情報の表現の詳細は不明である。そこで、報酬や嫌悪刺激（エアパフ）と条件づけられた視覚刺激を用いて、サル背側視床下部細胞の条件刺激、無条件刺激への反応を調べた。その結果、条件刺激、無条件刺激への反応は報酬確率により正または負の関係性をもって変化するもの、変化がないものと 3 種類ほぼ同数の細胞が確認された。また、報酬が 50%の確率で与えられるという不確実な条件で強く反応するものもあった。すなわち、ドパミンに比べて背側視床下部細胞の発火パターンは多くの種類があり、環境の変化による報酬情報の修飾のメカニズムである可能性が示唆された。結果は J.Neurophysiology に掲載された。				
2）ストレス下での意思決定行動変化の神経メカニズムの解明 強いストレスの存在下では、ヒト・動物において不適切な行動が起こりうる。しかし、ストレスや負の情動による意思決定機構の変化の神経メカニズムは不明である。我々は、嫌悪刺激と関連付けられた視覚刺激を呈示しつつ意思決定を行う行動課題を開発した。報酬・音・嫌悪刺激に関連付けられた 3 つの異なる視覚刺激のうち、2 つの視覚刺激を同時にサルに提示し、どちらか一方を、眼球運動を用いて選択させる。この結果、(報酬・音)に比べ(報酬・嫌悪)の組み合わせでは有意に報酬を選択する割合が減少し、瞳孔径が大きくなる傾向が見られた。このことは、嫌悪刺激と関連付けられた視覚刺激の選択肢としての存在が、サルにとってはストレスとなり、不適切な行動選択をしたことを示唆する。さらに、意思決定に重要な役割を担う線条体尾状核のニューロンでは、嫌悪刺激の存在する組み合わせで強く反応するニューロンが多く観察された。しかも、不適切な嫌悪刺激の選択の直前では発火が弱まった。このことから、尾状核ニューロンの発火が不適切な行動の抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。この因果関係を明らかにするために、行動課題中のサル尾状核にドパミン D1D2 拮抗剤を投与し行動の変化を調べた。その結果、特に D2 拮抗剤投与により嫌悪刺激提示時の反応時間の短縮、不適切選択の増加が観察された。D2 受容体は行動を抑制する大脳基底核間接路に属する細胞に多く出現していることから、間接路が嫌悪刺激によって引き起こされる衝動的行動を抑制し、ストレス下での正しい行動選択を可能にすることが示唆された。結果は 日本神経科学会で発表した。				
3）霊長類におけるセロトニン特異的回路操作法の開発 背側縫線核にはセロトニン細胞が最も多く分布するが、GABA などの別の種類の細胞も存在する。セロトニン特異的な投射の機能をあきらかにするために、カニクイサル 1 頭にセロトニン細胞選択的に発現する AAV ベクターを背側縫線核の中心に注入し、光応答、それに伴う行動変化を解析した。その結果、光応答と行動変化どちらも確認できた。セロトニン細胞選択的、時間選択的な脳機能の操作を霊長類において初めて可能とした。現在 1 頭の組織的解析を行っている。今後動物数を増やす予定である。				

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	生理学講座	事業推進者名	中村 加枝
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 1) <u>Nakamura, K.</u>, Ding, L. Parsing heterogeneous striatal activity. <i>Frontiers in Neuroanatomy</i> 査読有 11:43. 2017. 2) <u>Noritake, A.</u><u>Nakamura, K.</u> Encoding prediction signals during appetitive and aversive Pavlovian conditioning in the primate lateral hypothalamus <i>Journal of neurophysiology</i> 査読有 121:2 396-417 2019 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1) <u>Kae Nakamura</u>, “Dual processing in the primate dorsal raphe neurons for decision making under different mood “ International Society for Serotonin Research biennial meeting (Cork, Ireland, 2018/7) 2) <u>安田正治</u>, <u>上田康雅</u>, <u>中村加枝</u>, Emotional signals in primate dorsal raphe nucleus are modulated under choice. 第40回日本神経科学大会(千葉) 2017年7月 3) <u>Masaharu Yasuda</u>, <u>Yasumasa Ueda</u>, <u>Kae Nakamura</u>, Dual Processing in the Primate Dorsal Raphe Nucleus for Choice Behavior under different Mood. Society for Neuroscience (Washington DC), 699. 17, 2017(Nov) 4) <u>Sanada T.</u>, <u>M.</u>, <u>Kawabe T.</u>, <u>Nishida S.</u>, <u>Komatsu H.</u>, Neural response to complex motion in macaque area MT, サル MT 野における複雑運動刺激に対する反応特性, 第41回 日本神経科学学会(神戸) 2018年7月 5) <u>眞田尚久</u>, <u>河邊隆寛</u>, <u>西田 眞也</u>, <u>小松英彦</u>, 視覚運動による質感表現への生理学的アプローチ, 質感のつどい第3回公開フォーラム(大阪) 2017年11月 6) <u>眞田尚久</u>, <u>河邊隆寛</u>, <u>西田 眞也</u>, <u>小松英彦</u>, 複雑運動刺激に対する MT 野細胞の応答特性, 第21回視覚科学フォーラム(豊橋) 2017年9月 7) <u>Ueda Y.</u>, <u>Yasuda M.</u>, <u>Nakamura K</u> “Role of dopamine in the primate caudate for the decision making under different emotional context.” Neuroscience 2018 (San-Diego, CA, USA, 2018/11) 8) <u>Ueda Y.</u>, <u>Yasuda M.</u>, <u>Nakamura K</u> “Differential roles of dopamine D1 and D2 receptor function in the primate caudate for decision making under aversive context.” 第41回日本神経科学大会(神戸) 2018年7月 9) <u>倉岡康治</u>, <u>稲瀬正彦</u> Activity in response to preferred visual information in monkey amygdala neurons. 第40回日本神経科学大会(千葉) 2017年7月 10) <u>Kuraoka K.</u>, <u>Inase M.</u> Neuronal activity related to preference of visual stimuli in monkey amygdala. Society for Neuroscience (Washington DC, USA), 699. 21, 2017(Nov) <特許申請・取得状況> なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	医化学講座	事業推進者名	伊藤 誠二（平成 29 年度） 小林 拓也（平成 30 年度）
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	難治性神経疾患の病態解明と診断治療法の開発（平成 29 年度） 異常感覚を伴う神経可塑的变化とその病態に関する研究（平成 30 年度）		
キ ー ワ ー ド	糖尿病性ニューロパシー、神経再生、脊髄、プロスタグランジン		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	10 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 伊藤 誠二（平成 29 年度研究統括）、小林 拓也（平成 30 年度研究統括）、松村 伸治（疼痛に関わる脊髄イメージング）、片野 泰代（疼痛関連分子のプロテオミクス解析）、寿野 良二（GPCR の構造生物学）、中川 学（生化学分析）、西田 和彦（脊髄投射神経の発生学的解析）、井上 明俊（掻痒の中枢性感作機構）、前野 寛大（高圧 NMR 解析）、舩津 宣雄（生殖細胞特異的転写因子の解析）			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 難治性神経疾患、殊に、慢性疼痛である神経障害性疼痛などの異常感覚を伴う神経可塑的变化とその病態解明と診断治療法の開発に焦点を当て、神経障害性疼痛モデル マウス、各種遺伝子改変マウスを用いた解析、プロテオミクスによる新規疼痛関連分子の探索、および多光子励起顕微鏡を用いたイメージング技術を駆使した研究を展開してきた。さらに、損傷した末梢神経の再生機構、痒み刺激の伝達機構、体性感覚の伝達に関与する新規脊髄後角ニューロンの同定を行った。平成 30 年度より構造生物学的手法により、G タンパク質共役受容体の構造を明らかにし、今後その立体構造を基に慢性炎症、がん、精神疾患などに対して、より有効性が高く副作用の少ない治療薬の探索・開発の緒に就いた。			
平成 29 年度			
(1) 末梢神経再生の分子機構の解明 我々はこれまでマウス坐骨神経切断－再生モデルを確立し、再生した軸索の伸長を形態学的かつ機能的評価系を構築した。この系を用い、末梢神経の再生にはシュワン細胞に発現するエンドセリン受容体 (ETBR)、体液 Na ⁺ 濃度センサーとして働く Na ⁺ チャネル (Nax)、および乳酸が重要な役割を果たしていることを明らかにした。このシグナル伝達系の阻害剤を神経切断部位に持続的投与し、シュワン細胞における乳酸産生には Nax と直接相互作用する Na ⁺ /K ⁺ -ATPase が関与し、神経再生においてシュワン細胞からの乳酸が乳酸輸送体 MCT-4 によりニューロンに取り込まれることを示唆した。			
(2) 糖尿病における末梢神経障害を再現するモデルマウスの確立 糖尿病の合併症の一つに末梢神経障害があり、一次求心性線維の変性とそれに続く不完全な再生結果として慢性疼痛が惹起される。この末梢神経障害の治療法の確立を目的として、マウスを用い末梢神経障害を伴う 2 型糖尿病モデルを確立した。この糖尿病マウスで坐骨神経切断－再生モデルを作製し、再生能を評価すると、糖尿病マウスでは神経再生が有意に遅延した。糖尿病マウスの後根神経節では軸索伸長の阻害に関与するシグナル伝達分子 PTEN の発現が亢進したが、坐骨神経切断箇所にて PTEN の阻害剤を持続投与すると神経再生が有意に回復した。本研究で確立した 2 型糖尿病モデルによる末梢神経再生評価系は、将来的にこの疾患の治療に大きく貢献するものであると期待される。			

(3) 脊髄後角の体性感覚情報処理に関与する投射ニューロンの解析 脊髄後角は一次求心性線維により伝達された体性感覚を中継する部位であるが、脊髄後角に存在する様々なニューロンのうち高次脳中枢への伝達を直接担うのは投射ニューロンである。本研究ではこれらニューロンの発生時期と発生ドメインを明らかにし、その分子マーカーの同定を目指した。EdUを用いた神経細胞の誕生時期の解析より、投射ニューロンのほとんどは胎生 9.5 日目から 10.5 日目までに最終分裂を終えることが明らかとなった。この時期に生まれる脊髄後角ニューロンは脳室帯背側領域の 6 つの前駆細胞ドメイン (dI1-dI6) から発生することがこれまでの研究より明らかとなっている。そこで、dI4 から dI6 由来の Lbx1 系譜細胞を標識する遺伝子改変マウスを用いた解析、およびマーカー分子を用いた組織化学的解析をそれぞれ行った。その結果、投射ニューロンのほとんどは dI5 由来であることが明らかとなった。

平成 30 年度

(1) CASK-interacting protein 1 (Caskin1)の中樞神経系における機能的特徴の解析 カルシウム/カルモジュリン依存性セリンプロテインキナーゼ (CASK) -interacting protein 1 (Caskin1)は、in vitro で興奮性シナプス後部に含まれる足場タンパク質の CASK だけでなく他の神経タンパク質にも結合し、様々な神経機能を持つことが考えられているが、その役割は不明であった。以前、脊髄後角における Caskin1 が慢性疼痛下で増加することを示した。さらなる詳細な役割の解明を試みるため、Caskin1 ノックアウト (Caskin1-KO) マウスおよび特異的抗 Caskin1 抗体を作製した。これらを用い、Caskin1 が、中枢神経系の広い領域において、歩行、侵害受容、記憶、およびストレス反応を含む幅広い行動表現型に寄与することを明らかにした。

(2) G タンパク質共役受容体の立体構造の解明 急性炎症の痛みや腫れ、発熱、さらに動物のストレス行動、慢性炎症やがんにも関与するプロスタグランジン (PG) の、受容体の立体構造を世界で初めて X 線結晶構造解析によって解明した。膜たんぱく質を耐熱化させて立体構造を崩れ難くするアミノ酸置換を統計熱力学理論に基づいて短時間で予測する手法である理論的耐熱化予測法を利用して安定的なアミノ酸変異体を探索し、結晶の分解能を向上させることに成功した。それにより、EP4 拮抗薬 (ONO-AE3-208) が結合した EP4 と抗体の複合体の立体構造と PGE₂ が結合した EP3 の立体構造を解明した。EP3 と EP4 の全体構造は、2 番目の細胞外ループが β ヘアピン構造を取りオルソステリック部位に蓋をする。EP4 では ONO-AE3-208 は細胞の外側からダイレクトに受容体に結合するのではなく、一旦細胞膜の中に入り、脂質二重層との境界面に結合することが示唆された。PGE₂ は ONO-AE3-208 よりもさらに受容体の奥に入り込むことを明らかにした。さらに、EP3 はダイマーを形成し、脂質二重層の成分であるリン脂質がダイマーを安定化していることを示唆した。これらは、新しい薬剤の設計に繋がる重要な構造情報であり、多くの薬物の開発が期待されている標的分子・プロスタグランジン受容体の「形」が原子レベルで明らかにしたことで、今後その立体構造を基に慢性炎症、がん、精神疾患などに対して、より有効性が高く副作用の少ない治療薬の探索・設計が可能になると期待される。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	医化学講座	事業推進者名	伊藤 誠二（平成 29 年度） 小林 拓也（平成 30 年度）
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 1. Uchida H, Matsumura S, Okada S, Suzuki T, Minami T, Ito S. • RNA editing enzyme ADAR2 is a mediator of neuropathic pain after peripheral nerve injury. • The FASEB journal • 査読有 • 31(5):1847-1855 • 2017 2. Tu NH, Katano T, Matsumura S, Funatsu N, Pham VM, Fujisawa JI, Ito S. • Na⁺/K⁺-ATPase coupled to endothelin receptor type B stimulates peripheral nerve regeneration via lactate signaling. • The European journal of neuroscience • 査読有 • 46(5):2096-2107 • 2017 3. Nishida K, Ito S • Developmental origin of long-range neurons in the superficial dorsal spinal cord. • The European journal of neuroscience • 査読有 • 46(10):2608-2619 • 2017 4. 伊藤 誠二, Tu Nguyen H., Pham Vuong H., 片野 泰代, 松村 伸治 • 神経細胞特異的に蛍光タンパクを発現するマウスを用いた坐骨神経切断-再生モデルの確立と神経再生メカニズムの解析 • 麻酔 • 査読無 • 66 巻増刊:S148-S156 • 2017 5. 伊藤 誠二 • 痛みの生化学 最近 20 年の進歩 • 生化学 • 査読無 • 89(6):841-855 • 2017 6. Vuong PM, Nguyen HT, Katano T, Matsumura S, Saito A, Yamada A, Furue H, Ito S. • Impaired peripheral nerve regeneration in type-2 diabetic mouse model. • The European journal of neuroscience • 査読有 • 47(2):126-139 • 2018 7. Suno R, Terakado-Kimura K, Nakane T, Yamashita K, Wang J, Fujiwara T, Yamanaka Y, Im D, Horita S, Tsujimoto H, Tawaramoto-Sasanuma M, Hirokawa T, Nango E, Tono K, Kameshima T, Hatsui T, Joti Y, Yabashi M, Shimamoto K, Yamamoto M, Rosenbaum DM, Iwata S, Shimamura T, and Kobayashi T. • Crystal Structures of Human Orexin 2 Receptor Bound to the Subtype-Selective Antagonist EMPA • Structure • 査読有 • 26(1,2):7-19 • 2018 8. Harada M, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E. • Development of a novel photoaffinity probe for labeling nocistatin receptor. • Biochemical and biophysical research communications • 査読有 • 501(2):514-519 • 2018 9. Kitamura A, Shibasaki A, Takeda K, Suno R and Kinjo M. • Analysis of the substrate recognition state of TDP-43 to single-stranded DNA using fluorescence correlation spectroscopy. • Biochemistry and Biophysics Reports • 査読有 • 14:58-63 • 2018 10. Katano T, Takao K, Abe M, Yamazaki M, Watanabe M, Miyakawa T, Sakimura K, Ito S. • Distribution of Caskin1 protein and phenotypic characterization of its knockout mice using a comprehensive behavioral test battery. • Molecular brain • 査読有 • 11(1):63 • 2018 11. Uchida H, Matsumura S, Katano T, Watanabe M, Schlossmann J, Ito S. • Two isoforms of cyclic GMP-dependent kinase-I exhibit distinct expression patterns in the adult mouse dorsal root ganglion. Molecular pain • 査読有 • 14:1744806918796409 • 2018 12. Nakamura M, Nomura S, Yamakawa T, Kono R, Maeno A, Ozaki T, Ito A, Uzawa T, Utsunomiya H, Kakudo K. • Endogenous calcitonin regulates lipid and glucose metabolism in diet-induced obesity mice. • Scientific reports • 査読有 • 8(1):17001 • 2018 13. Suno R, Lee S, Maeda S, Yasuda S, Yamashita K, Hirata K, Horita S, Tawaramoto SM, Tsujimoto H, Murata T, Kinoshita M, Yamamoto M, Kobilka BK, Vaidehi N, Iwata S and Kobayashi T. • Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor. • Nature chemical biology • 査読有 • 14(12):1150-1158 • 2018 14. Toyoda Y, Morimoto K, Suno R, Horita S, Yamashita K, Hirata K, Sekiguchi Y, Yasuda S, Shiroishi M, Shimizu T, Urushibata Y, Kajiwara Y, Inazumi T, Hotta Y, Asada H, Nakane T, Shiimura Y, Nakagita T, Tsuge K, Yoshida S, Kuribara T, Hosoya T, Sugimoto Y, Nomura N, Sato M, Hirokawa T, Kinoshita M, Murata T, Takayama K, Yamamoto Y, Narumiya S, Iwata S and Kobayashi T. • Ligand binding to human prostaglandin E receptor EP4 at the lipid-bilayer interface. • Nature chemical biology • 査読有 • 15(1):18-26 • 2018 15. Morimoto K, Suno R, Hotta Y, Yamashita K, Hirata K, Yamamoto M, Narumiya S, Iwata S, Kobayashi T. • Crystal structure of the endogenous agonist-bound prostanoid receptor EP3. • Nature chemical biology • 査読有 • 15(1):8-10 • 2019 16. Sakurai K, Maeno A, Lee YH, Akasaka K • Conformational Properties Relevant to the Amyloidogenicity of β2-Microglobulin Analyzed Using Pressure- and Salt-Dependent Chemical Shift Data. • The journal of physical chemistry. B • 査読有 • 123(4):836-844 • 2018			

17. 前野寛大, 金折賢二, 藤井茂, 山崎彬, 赤坂一之・圧力-温度処理による芽胞死滅の高圧 NMR 観測・高圧力の科学と技術・査読有・28(2):113-122・2018
18. 片野 泰代・プロテオミクス解析による脊髄後角後シナプス肥厚部からの新規神経障害性疼痛関連分子の同定・生化学・査読無・90(6):810-814・2018

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数)

1. 伊藤 誠二・講談社痛覚のふしぎ-脳で感知する痛みのメカニズム-・2017・218 ページ

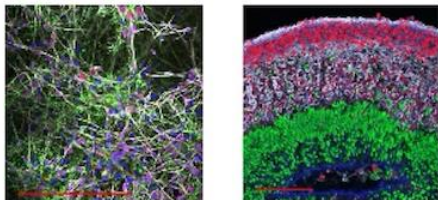
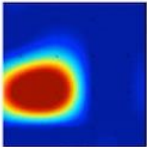
<学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月)

1. 伊藤誠二, Nguyen Huu Tu, Pham Minh Vuong, 片野泰代, 松村伸治・神経細胞特異的に蛍光タンパクを発現するマウスを用いた坐骨神経切断-再生モデルの確立と神経再生メカニズムの解析・日本麻酔科学会第 64 回学術集会・神戸・2017/06
2. 西田和彦, 伊藤誠二・脊髄後角長距離投射ニューロンの発生・第 40 回日本神経科学大会・千葉・2017/07
3. 片野泰代, 福田正史, 山崎真弥, 阿部学, 渡辺雅彦, 矢尾育子, 奥村宣明, 中澤敬信, 山本雅, 崎村建司, 高尾敏文, 伊藤誠二・脊髄後角における神経障害性疼痛関連分子 BEGAIN の同定・第 40 回日本神経科学大会・千葉・2017/07
4. 内田仁司, 松村伸治, 崎村建司, 伊藤誠二・神経障害性および炎症性疼痛モデルにおける RNA 編集異常・第 68 回日本薬理学会北部会・山形・2017/09
5. 井上明俊, 中澤敬信, 伊藤誠二・痒みの神経伝達において NMDA 受容体 GluN2B サブユニットの Tyr1472 のリン酸化は重要である・日本生理学会第 110 回近畿生理学談話会・神戸・2017/11
6. 内田仁司, 松村伸治, 崎村建司, 伊藤誠二・発生および慢性疼痛下の一次知覚神経における RNA 編集の変動・2017 年度生命科学系学会合同年次大会・神戸・2017/12
7. Katano, T. and Ito, S・Search of BEGAIN binding protein in the brain・The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience・Washington DC, USA・2017/11
8. Ito S, Nguyen TH, Katano T, Matsumura S, Funatsu F, Pham VM・Na⁺/K⁺-ATPase coupled to ETBR promotes peripheral nerve regeneration via lactate signaling.・The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience・Washington DC, USA・2017/11
9. Pham VM, Nguyen TH, Katano T, Matsumura S, Ito S・Impaired peripheral nerve regeneration in type 2 diabetic mouse model.・The 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience・Washington DC, USA・2017/11
10. Katano, T., Fukuda, M., Yamazaki, M., Abe, M., Watanabe, M., Yao, I., Okumura, N., Nakazawa, T. Yamamoto, T., Sakimura, K., Takao, T. and Ito, S.・Identification of novel neuropathic pain-related proteins.・BRI The 8th International Symposium・Niigata, JAPAN・2018/02
11. 片野泰代, 高雄啓三, 阿部学, 山崎真弥, 渡辺雅彦, 宮川剛, 崎村建司, 伊藤誠二・CASK-interacting protein 1 (Caskin1) の中枢神経系における機能的特徴の解析・第 41 回日本神経科学大会・神戸・2018/07
12. 前野寛大, 金折賢二, 赤坂一之・圧力殺菌過程で生じる細菌芽胞の不可逆的構造変化・第 59 回高圧討論会・岡山・2018/11
13. Akasaka K, Maeno A, Fujii S, Kanaori K・On-line high-pressure NMR technique applied to bacterial spores.・59th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference・Orlando, USA・2018/04
14. Pham, M.V., Nguyen H.T., Katano, T., Matsumura, S. and Ito, S.・Delayed nerve regeneration in type-2 diabetic mice.・7th International Conference in Vietnam on the Development of Biomedical Engineering (BME7)・Ho Chi Minh City, VIETNUMN・2018/06
15. Maeno A, Kanaori K, Akasaka K・Evidence that pressure causes irreversible changes in the structure of bacterial spore: A combined NMR, SEM and fluorescence microscopic approach・10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology・Numazu, JAPAN・2018/09
16. Katano, T., Takao, K., Abe, M., Yamazaki, M., Watanabe, M., Miyakawa, T., Sakimura, K. and Ito, S.・Protein Distribution and functional characterization of CASK-interacting protein 1 (Caskin1) in mice.・The 48th annual meeting of the Society for Neuroscience・San Diego, CA, USA・2018/11

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講座等名	iPS・幹細胞応用医学講座	事業推進者名	六車 恵子
所属部門	神経部門		
分担研究課題	多能性幹細胞からの脳組織の構築およびその破綻に関する研究		
キーワード	iPS 細胞、ES 細胞、脳オルガノイド、3D 培養、神経疾患、画像取得、画像解析		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	2 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 六車 恵子（教授）：研究統括。研究の立案、遂行。 玉田 篤史（准教授）：研究の立案、遂行。			
研究成果の概要（平成 30 年度の研究成果について） 本講座は平成 30 年度より参加し、ヒト脳オルガノイド（脳様組織体）の作製・解析・操作技術を駆使することで、ヒト脳の発生と機能発現の機構を解明し、神経疾患の克服につなぐことを目指している。			
1)ヒト iPS 細胞からの脳オルガノイドの作製 これまでに、ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から大脳や小脳など様々な脳領域を分化誘導するための自己組織的立体培養法 SFEBq 法を開発した。SFEBq 法はヒト iPS 細胞にも適用可能である。本分担研究課題においては、既に作製済みの健常対象由来の iPS 細胞から大脳または小脳皮質を分化誘導し、これまで困難であったヒト脳の立体組織を用いた発生・可塑性・機能発現に関する実証的な実験研究を目指した。さらに、樹立済みの神経疾患特異的 iPS 細胞からも同様に脳組織を作製し、免疫組織学的または分子生物学的な解析により、組織構築の原理と構造破綻に至る機構に関連する表現型の抽出を試みた。			
2)異常な神経活動を引き起こす組織構造の再現 脳形成障害や腫瘍性病変など組織構造の異常・破綻は、外科的介入を伴う難治性てんかんの発作焦点となり得る可能性が示唆されている。神経活動の異常をもたらす組織の微細構造や神経ネットワークを解明するため、iPS 細胞由来の脳オルガノイドを用い、2 次元または 3 次元のてんかんモデルを作製し、4 次元画像解析、生理機能計測技術の開発を進めた。			
iPS細胞 → 大脳皮質 自己組織化  多点電極記録 膜電位・カルシウム計測 定常静穏状態  過剰興奮状態  ↔ まれな 状態遷移			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	iPS・幹細胞応用医学講座	事業推進者名	六車 恵子
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 1) <u>Tamada A</u>, Chiral Neuronal Motility: The missing link between Molecular Chirality and Brain Asymmetry. Symmetry 11(1), 102, 2019. (Invited review), レフェリー無 2) Kawasaki A, Okada M, <u>Tamada A</u> (Co-first author), Okuda S, Nozumi M, Ito Y, Kobayashi D, Yamasaki T, Yokoyama R, Shibata T, Nishina H, Yoshida Y, Fujii Y, Takeuchi K, Igarashi M. Growth cone phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration. iScience 2018; 4, 190-203. レフェリー有 3) Eguchi N, Sora I, <u>Muguruma K</u>, Self-organizing cortex generated from human iPSCs with combination of FGF2 and ambient oxygen. Biochem Biophys Res Commun 2018; 498(4), 729-35. レフェリー有 4) <u>Tamada A</u>, Igarashi M. Revealing chiral cell motility by 3D Riesz transform-differential interface contrast microscopy and computational kinematic analysis. Nat Commun 2017; 8(1), 2194. レフェリー有 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 1) 六車恵子, iPS細胞を用いた小脳の発生と病態の解明, Clinical Neuroscience, 37(8), 小脳学習説 Marr-Albus-Ito 理論の 50 年, 中外医学社, 2019 (in press). 2) 六車恵子, 小脳オルガノイドの作製とプルキンエ細胞への誘導. 実験医学別冊 決定版オルガノイド実験スタンダード, pp.77-86, 羊土社, 2019. 3) 六車恵子, iPS細胞を活用した脊髄小脳変性症研究の現状, 難病と在宅ケア, 24, pp.54-57, 日本プランニングセンター, 2018. 4) 六車恵子, iPS細胞による再生医療研究, 脊髄小脳変性症, Clinical Neuroscience, 36(3), pp.316-19, 中外医学社, 2018. 5) <u>Muguruma K</u>, Self-organized cerebellar tissue from human pluripotent stem cells and its application to clinical medicine, in Organ Regeneration Based on Developmental Biology, pp.25-40, Springer Nature, Singapore, 2017. 6) <u>Muguruma K</u>, 3D culture for self-formation of the cerebellum from human pluripotent stem cells through induction of the isthmus organizer, in Organ Regeneration -3D Stem cell culture & Manipulation. Methods in Molecular Biology Vol 1597, Springer Protocol, pp.31-41, Humana Press, New York, 2017. <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1) <u>Muguruma K</u>, in vitro models of cerebellar development and spinocerebellar degeneration utilizing human iPSCs. The 75th Fujihara Seminar, Tokyo, JAPAN, December 2, 2018. (invited talk) 2) <u>Muguruma K</u>, Construction of brain tissues from iPSCs for investigation of disease mechanisms. The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018). Kyoto, JAPAN, July 4, 2018. (invited talk) 3) <u>Muguruma K</u>, Construction of brain tissues from iPSCs for investigation of disease mechanisms. Keystone Symposium, iPSCs: A decade of progress and beyond. Olympic Valley, CA, USA, March 28, 2018. (invited talk) 4) <u>Muguruma K</u>, Disease modeling with patient derived iPSC cells. The Society for Research on the Cerebellum, 8th International Symposium "Cerebellum: from Development to Disease". Winnipeg, CANADA, May 25, 2017. (invited talk) 5) 一色庸平, Nancy Vi, SL Karsten, 六車恵子, 横川隆司, 神経系前駆細胞の分化誘導に向けた濃度勾配形成デバイスの評価, 第 35 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム, センサ・マイクロマシン部門大会, 札幌, 2018 年 10 月. <特許申請・取得状況> 1) 特許 6443707 号・発明者: 笹井芳樹, 六車恵子, 塚田亮平, 田中速雄・発明の名称「単一細胞凝集塊形成用培養容器」・出願人: 国立研究開発法人理化学研究所、住友ベークライト株式会社. 2) PCT/JP2014/520076・Yoshiki Sasai, <u>Keiko Muguruma</u>, Ryohei Tsukada, Hayao Tanaka・「Vessel for culturing human es cells」・RIKEN, Sumitomo Bakelite Co.,Ltd. 3) 特願 2014-182758・発明者: 六車恵子, 笹井芳樹・発明の名称「小脳前駆組織の製造方法」・出願人: 国立研究開発法人理化学研究所、住友化学株式会社.			

- 4) PCT/JP2015/075412 (日本、欧州、米国、その他 11 カ国)・Yoshiki Sasai, Keiko Muguruma・「Method for producing cerebellar progenitor tissue」・RIKEN, Sumitomo Chemical Co., Ltd.

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	衛生・公衆衛生学講座	事業推進者名	神田 靖士
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	マウス万能細胞を用いた立体的組織の構築と骨粗鬆症に対する漢方製剤治療メカニズムの解明		
キ ー ワ ー ド	組織幹細胞、SP cells、auditory pathway、骨粗鬆症、漢方製剤		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
西山利正	教授	研究の統括	
神田靖士	准教授	大学院生などの研究指導並びに幹細胞の特徴付けと遺伝子発現の解析	
下埜敬紀	助教	幹細胞の特徴付け（細胞培養とシーケンス解析）と遺伝子導入	
杉本秀生	大学院生	骨粗鬆症における漢方製剤治療メカニズムの解明	
岡崎はるか	研究員	内耳の聴覚伝導路（特に下丘）における組織幹細胞の探索	
王澤蘊	研究員	漢方製剤の治療メカニズムの解明	
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
更年期障害に対して処方される漢方製剤のエストロゲン活性の検討			
In vitro におけるラット下垂体腫瘍細胞 MtT/Se と酵母 two-hybrid system による漢方製剤のエストロゲン作用を検討した結果、温経湯、加味逍遙散、女神散においてコントロールと比較して有意に高いエストロゲン活性を有していた。また、S9 による代謝後の活性を検討したところ温経湯と女神散において代謝前と比較して有意に増強していた。さらに、最も高いエストロゲン活性が検出された温経湯の個々の構成生薬を用いて同様にエストロゲン活性を検討した結果、カンゾウ、ケイヒ、ゴシュユ、ショウキョウにおいて高いエストロゲン活性が検出された。またこれらの活性が認められた生薬を 2 種類ずつ混合した時の相加・相乗効果を検討した結果、カンゾウとゴシュユ、ゴシュユとケイヒの組合せにより β 型エストロゲン活性の相乗効果が認められた。			
また前述の β 型エストロゲン活性を有していた 3 つの漢方製剤（温経湯、女神散、加味逍遙散）および補中益気湯、加味帰脾湯を用いてマウス破骨前駆細胞(RAW264 細胞)に投与し、成熟破骨細胞への分化過程における作用を in vitro で検討することを目的とした。TRAP 染色の結果、RANKL のみ添加した RAW264 細胞は成熟破骨細胞へ分化誘導したが、これに E2 を添加した場合、その分化は顕著に抑制された。また、先行研究でエストロゲン β 活性を有していた漢方製剤、温経湯、女神散、加味逍遙散にはいずれも成熟破骨細胞への分化を有意に抑制していた。また、分化過程に於ける転写因子の遺伝子発現の変化を検討した結果、成熟破骨細胞への分化を抑制していることが分かった。			
聴覚伝導路における組織幹細胞の同定と特徴付け			
今回の研究では、中枢聴覚伝導路のなかでもすべての上行聴覚情報が経路し音情報を最初に統合する重要な核である下丘において、幹細胞のマーカーとして報告がある Prominin-1(CD133)抗原に注目し、新生仔マウス下丘における神経幹/前駆細胞を濃縮、分離し、遺伝子発現や分化能を検討する事を目的とした。Prominin-1 の発現を q-PCR を用いて検討したところ生後 1 週未満の下丘における発現が 3 週以降と比較して有意に高い事が示された。新生仔マウス下丘から取得した Prominin-1 陽性細胞の割合は成体に比し有意に高く、更に Prominin-1 陽性細胞の sphere 形成能を検討したところ、新生仔において、unsorted cells、Prominin-1 陰性細胞から形成されたものより有意に多い事が分かった。免疫染色により、新生仔マウス下丘の Prominin-1 陽性細胞に幹細胞マーカーである SOX2 が共発現しており、Prominin-1 陽性細胞から形成された sphere に SOX2、神経幹前駆細胞のマーカーである Nestin の発現を認め、分化誘導することにより神経、グリアへ分化する事を示した。			
問題点			
現在、今年度の結果を受けて漢方製剤を用いた骨粗鬆症に対する予防及び治療効果を in vivo 及び in vitro で検討している。現在、骨粗鬆症モデルマウスを作成するため RANKL をリコンビナントタンパクとして発現、精製を実施している。しかしながら現在までに発現ベクターへのクローニングを終えたが、精製のステップで時間がかかっており、今後早急に進めて in vivo での実験を進めていく予定である。			

優れた成果があがった点

漢方製剤の骨粗鬆症に対する治療効果のメカニズムの解明を行う事を目的に、*in vitro* で破骨前駆細胞から成熟破骨細胞への分化過程に及ぼす影響を検討した。その結果、漢方製剤の有するエストロゲン作用により破骨細胞の分化過程において作用し、分化を抑制したものと推測された。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	衛生・公衆衛生学講座	事業推進者名	神田 靖士
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 1. <u>Okazaki H</u>, Kanda A, <u>Kanda S</u>, <u>Shimono T</u>, Yun Y, Kobayashi Y, <u>Wang Z</u>, Ooka H, Suzuki K, Dan Bui Van, Tomoda K, Iwai H, and <u>Nishiyama T</u> Mol Neurobiol. 2018 Jun;55(6):4998-5005 （査読有り） 2. <u>Wang Z</u>, <u>Kanda S</u>, <u>Shimono T</u>, Enkh-Undraa D, <u>Nishiyama T</u>. The in vitro estrogenic activity of the crude drugs found in Japanese herbal medicines prescribed for menopausal syndrome was enhanced by combining them. BMC Complement Altern Med. 2018 18(1):107 （査読有り） 3. <u>王 澤蘊</u>、<u>神田 靖士</u>、<u>下埜 敬紀</u>、<u>西山 利正</u> β型エストロゲン活性産婦人科漢方研究のあゆみを示す生薬の組み合わせによる相乗効果の検討 産婦人科漢方研究のあゆみ 34 p.47-52 2017 （査読有り） <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 該当なし <学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） 1. Pheophet Lamaningao, Seiji Kanda, Sakhone Laimanivong, Takaki Shimono, Andrew Waleluma Darcy, Amphay Phyaluanglath, Nobuyuki Mishima, and Toshimasa Nishiyama Development of a PCR Assay for Diagnosing Trematode (Opisthorchis and Haplorchis) Infections in Human Stools. 11th National Health Research Forum “Health Research Capacity Strengthening toward Sustainable Development, Vientiane, Lao PDR, 2018/10 2. 漢方製剤の破骨細胞分化過程に及ぼす効果(予報) 杉本秀生、神田靖士、下埜敬紀、方 軻、益本英幸、西山利正 婦人科漢方研究会 2018年9月 3. A.W.Darcy, Seiji Kanda, T.Dalipanda, C Joshua, Takaki Shimono, Pheophet Lamaningao, Nobuuki Mishima, Toshimasa Nishiyama. Dengue 2016 sero-prevalence study in Solomon Islands; a Changing outbreak Pattern in small island settings 12th Asia Pacific Travel Health Conference, Bangkok, Thailand, 2018/3 <特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	神経機能部門	事業推進者名	小早川 令子
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	嗅覚刺激による先天的な恐怖情動の誘発を担う受容体分子の解明		
キ ー ワ ー ド	恐怖、先天的、受容体遺伝子、フォワードジェネティクススクリーニング		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	6 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 神経機能部門に所属する5名の研究者（松尾朋彦、土井昭宏、伊早坂智子、林勇一郎、小早川高、小早川令子）が本プロジェクトに必要な分子生物学、免疫組織化学、イメージング、行動学の実験を共同で実施した。			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 恐怖は基本的な情動であり、危険な状況において個体の生存を高めるための行動と生理的反応を誘発する。恐怖は先天的と後天的なメカニズムによって誘発される。げっ歯類は、匂い・音・視覚刺激などの条件刺激と電気ショックなどの無条件刺激を関連学習することにより、条件刺激に対してすくみ行動を示す様になることが知られている。これに対して、実験室で飼育されたげっ歯類は、何世代も天敵から隔離された条件で飼育されているにもかかわらず、本能的に天敵を恐れることが知られている。従って、先天的恐怖は進化的に保存され、遺伝的にコードされた生存メカニズムであると考えられる。そこで、我々は、先天的恐怖の分子メカニズムをフォワードジェネティクスにより明らかにすることは実行実現性が高いと考え、これを明らかにするための研究を行った。 キツネの分泌物に含まれる TMT は、カイロモンとして最もよく知られており、TMT に未感作のマウスに対して本能的なすくみ行動を誘発することが知られている。TMT に行動が類似した 2MT は、強力な先天的すくみ行動を誘発する匂い分子として、我々の研究室により発見された(Cell 2015)。しかしながら、TMT や 2MT による先天的な恐怖行動の誘発に関与する決定的な分子メカニズムに関しては明らかにされていなかった。そこで、私たちはランダムに変異を導入したマウスから劣勢の変異マウスを大規模にスクリーニングするフォワードジェネティクススクリーニングを行うことで、2MT によって誘発される強力な先天的な恐怖行動を誘発する遺伝子を同定する研究を行なった。 我々は、マウスの ENU ミュータジェネシスによる大規模な劣勢変異スクリーニングを行うことで、TMT および 2MT による先天的恐怖行動誘発にかかわる遺伝子の同定を行った。フォワードジェネティクススクリーニングを行う上では、強力なアッセイ系を確立することが不可欠となる。これまで試みられてきた後天的恐怖行動を担う分子のスクリーニングは、後天的恐怖行動にばらつきがあることが技術的に難しかった。これに対して、強力な先天的恐怖を誘発する人工恐怖臭である 2MT によって誘発されるすくみ行動は、学習を必要としないために、操作が簡便であり、TMT によって誘発されるすくみ行動に比較するとはるかに強力で、個体間のばらつきが非常に少ないことから、2MT を用いた行動アッセイ系を用いてフォワードジェネティクススクリーニングを行った。 上述した大規模フォワードジェネティクスを用いて 13,222 匹の G3 マウスをスクリーニングし、2MT に対するすくみ行動に異常のある変異マウスを同定した結果、Fearless と名付けた Trpa1 遺伝子が null mutant となっているファミリーで 2MT に対するすくみ行動が顕著に減少した。ENU による Trpa1 の変異が fearless マウスで観察された表現系の異常の単独の原因であることを確認するために、Trpa1 ノックアウトマウスを入手し Trpa1 ノックアウトマウスの表現系の解析を行なった。Trpa1 ノックアウトマウスではヘテロマウスに比較すると 2MT や TMT に対するすくみ行動が完全に消失しており、また 2MT による血中コルチコステロンの上昇がほぼ完全に消失した。また、低濃度の 2MT に対する忌避行動、驚愕反応、リスクアセスメント行動が減少し、蛇の皮によって誘発される各種忌避行動も顕著に減少していた。これらの結果から、Trpa1 遺伝子は匂いによって誘発される先天的な恐怖行動や防御行動に重要な役割を果たすことが示された。 Trpa1 は三叉神経に発現することが知られている。そこで、我々は 2MT による先天的すくみ行動の誘発における三叉神経系の関与を明らかにするために三叉神経系の破壊実験を行なった。両側の三叉神経系の破壊を行うとマウスは 2-3 日以内に死亡してしまったことから、片側の破壊を行なった。片側の三叉神経系を破壊したマウスでは、2MT によるすくみ行動が顕著に減少することが明らかになった。逆に、Trpa1 ノックアウトマウスの三叉神経節に Trpa1 を AAV を用いてレスキューすると 2MT に対するすくみ行動が誘発されるようになった。以上の結果から、これまで主に侵害受容に関わると考えられてきた三叉神経経路の Trpa1 が嗅覚による先天的恐怖行動の誘発に主要な役割を果たすことが明らかになった(Nat Comm 2018)。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	神経機能部門	事業推進者名	小早川 令子
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 1. Sato T, Katsuoka Y, Yoneda K, Nonomura M, Uchimoto S6, <u>Kobayakawa R</u>, <u>Kobayakawa K</u>, Mizutani Y. Sniffer mice discriminate urine odours of patients with bladder cancer: A proof-of-principle study for non-invasive diagnosis of cancer-induced odours. Sci. Rep. 査読あり 7: 14628 (2017) 2. Wang Y, Cao L, Lee CY, <u>Matsuo T</u>, Wu K, Asher G, Tang L, Saitoh T, Russell J, Klewe-Nebenius D, Wang L, Soya S, Hasegawa E, Chérasse Y, Zhou J, Li Y, Wang T, Zhan X, Miyoshi C, Irukayama Y, Cao J, Meeks JP, Gautron L, Wang Z, Sakurai K, Funato H, Sakurai T, Yanagisawa M, Nagase H, <u>Kobayakawa R</u>, <u>Kobayakawa K</u>*, Beutler B*, Liu Q*. (*corresponding authors) Large-scale forward genetics screening identifies Trpa1 as a chemosensor for predator odor-evoked innate fear behaviors. Nat Comm. 査読あり 9(1): 2041 (2018) <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1. Reiko Kobayakawa. Htr2a-expressing cells in the central amygdala control the hierarchy between innate and learned fear. 第40回日本神経科学大会、千葉、2017年7月20～23日 2. 小早川 高 「先天的と後天的な嗅覚情報の意味判断と統合処理メカニズム」、生理学研究会『先天的と後天的なメカニズムの融合による情動・行動の理解と制御』、岡崎、2017年10月10～11日 3. 小早川 令子、花尻 瑠璃、小早川 高 「D9-THC, JWH-018m 5-fluoro-ADB が誘発するマウスの脳活動と行動」、日本法中毒学会第36回年会、東京、2017年7月6～7日 4. Reiko Kobayakawa. Sensory representations and integrational processing for innate versus learned olfactory behaviors and beyond. 第41回日本神経科学大会、神戸、2018年7月26～29日 5. 小早川 高 「先天的恐怖誘導性危機応答モードによる生命保護」、生理研研究会『感覚免疫学研究会』、岡崎、2018年6月7～8日 6. 小早川 高 「先天的と後天的な行動制御メカニズムとその生理学的意義」、第11回北陸合同バイオシンポジウム、金沢、2018年10月26日 7. 小早川 高 Innate fear odors orchestrate life-or-death effects in mice. 遺伝研研究会「Circuit construction in the mammalian brain (哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム)」、三島2018年12月20-21日 <特許申請・取得状況> なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	細胞機能部門	事業推進者名	小原 圭吾
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	神経細胞と神経回路の光イメージング研究		
キ ー ワ ー ド	神経細胞、神経回路、イメージング		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
小原圭吾（平成 30 年度から研究統括） 林美樹夫（平成 29 年度 膜タンパクのイメージング） 武藤恵（平成 29 年度 シナプス可塑性の電気生理学的解析） Andharia Naaz（平成 29 年度 病因分子のイメージング） 松田博子（平成 29 年度研究統括）			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
平成 29 年度			
膵臓は消化・吸収に必須である膵液を分泌する。小葉間膵管の管腔側膜のイオン輸送体は高濃度の重炭酸イオンを含む膵液分泌の律速段階となっている。管腔側膜におけるイオン輸送の機能解析は、高度な技術と専門知識を要するため 20 年以上ほとんど進展していない。そこで本研究は、小葉間膵管の管腔側膜に存在する重炭酸イオン輸送体の電気生理学的同定を試みた。さらに、小葉間膵管に発現する重炭酸イオン輸送体の分子基盤を同定した。モルモットから小葉間膵管を新鮮分離した。マイクロマニピュレーターを用いて膵管を開裂し、管腔側膜を露出した。パッチクランプ法を用いて管腔側膜の電流を測定し、重炭酸イオンコンダクタンスの生物物理学的の性質および薬理学的の性質を解析した。生理的な細胞内の重炭酸イオン濃度において、重炭酸イオンコンダクタンスが観察された。細胞外の Cl⁻ 濃度を低下させると、重炭酸イオンコンダクタンスは減少した。陰イオン交換輸送体の抑制薬（H₂DIDS）は重炭酸イオンコンダクタンスを減少させた。細胞内 cAMP は重炭酸イオンコンダクタンスを増加させなかった。小葉間導管において SLC26A ファミリーの mRNA の発現を認めた。既に報告されていた SLC26A6 に加え、SLC26A1、SLC26A4、および SLC26A10 が管腔側膜に局在していた。膵臓導管に発現する SLC26A1、SLC26A4、SLC26A6、および SLC26A10 タンパク質の分子量は 80-140 kDa であった。これら SLC26A ファミリーにより構成される陰イオン交換輸送体が膵臓導管細胞における重炭酸イオン分泌に寄与することが示唆された。			
平成 30 年度			
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。近年になって、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、海馬新 CA2 領域および海馬近傍領域において、新たな「細胞」「神経回路」「領域」の探索を行っている。他グループによるこれまでの報告と異なり、新 CA2 神経細胞が嗅内皮質へ軸索を投射しないことが明らかになった。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	細胞機能部門	事業推進者名	小原 圭吾
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) <u>Taketo M, Matsuda H</u> Short-term inhibition of GABAergic IPSCs induced by association of pre- and postsynaptic activation in the neonatal hippocampus. Neuropharmacology・レフェリー有・121:39-48・2017 年 <u>Andharia N, Hayashi M, Matsuda H</u> Electrophysiological properties of anion exchangers in the luminal membrane of guinea pig pancreatic duct cells. <i>Pflügers Archiv – European Journal of Physiology</i>・レフェリー有・470(6)・897–907・2018 年 <u>Taketo M</u> Metabotropic glutamate receptor 1-mediated calcium mobilization in the neonatal hippocampal marginal zone. Eur J Neurosci・48:3344–3353・2018 年 Inagaki A, <u>Hayashi M, Andharia N, Matsuda H</u> Involvement of butyrate in electrogenic K⁺ secretion in rat rectal colon. <i>Pflügers Archiv – European Journal of Physiology</i>・レフェリー有・471(2)・313–327・2019 年 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) <u>小原 圭吾 (分担執筆)</u>・ブレインサイエンスレビュー 2018・クバプロ・ 「古典定義の打破と新 CA2 領域の出現、そして新たな海馬地図」・2018・20P (分担執筆分) <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 名黒 功、<u>小原 圭吾</u>、一條 秀憲 レポーターマウスを用いた浸透圧応答性キナーゼ ASK3 の組織発現分布の解析 生命科学系学会合同年次大会・神戸・2017 年 12 月 大舟晃平, 岩田亮一, <u>林美樹夫</u>, 吉村晋一, 埜中正博, <u>松田博子</u>, 浅井昭雄 非選択性陽イオンチャネルを標的とした悪性脳腫瘍の治療法の開発 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会・岐阜・2017 年 9 月 大舟晃平, 岩田亮一, <u>林美樹夫</u>, 吉村晋一, 埜中正博, <u>松田博子</u>, 浅井昭雄 TRP channel を標的とした悪性脳腫瘍の治療法の開発 第 15 回がんハイポキシア研究会・淡路・2017 年 11 月 岩田亮一, 大舟晃平, <u>林美樹夫</u>, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 埜中正博, <u>松田博子</u>, 浅井昭雄 グリオーマがん幹細胞に対する非選択性陽イオンチャネルを標的とした治療効果 第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会・高松・2017 年 11 月 <u>Andharia N, Hayashi M, Matsuda H</u> Anion conductance in the luminal membrane of guinea pig pancreatic duct cells. 第 110 回近畿生理学談話会・神戸・2017 年 11 月 <u>Andharia N, Hayashi M, Matsuda H</u> Anion exchanger in the luminal membrane of guinea pig pancreatic duct cells. 第 95 回日本生理学会大会・高松・2018 年 3 月 <u>Hayashi M, Iwata R, Andharia N, Ofune K, Yoshimura K, Nonaka M, Asai A, Matsuda H</u>			

Functional expression of adenosine A_{2B} receptor in pancreatic duct cells.

第 95 回日本生理学会大会・高松・2018 年 3 月

Taketo M, Matsuda H,

Function of metabotropic glutamate receptors in the marginal zone of neonatal rat hippocampi

第 95 回日本生理学会大会・高松・2018 年 3 月

Saito T, Iwata R, Maruyama M, Nakano Y, Ofune K, Matsuda S, Kaibori M, Murakawa T, Hayashi M
Biologic Profiling of Brain Metastasis from Non-Small Cell Lung Cancer.

IASLC 19th World Conference on Lung Cancer・Toronto, Canada・2018 年 9 月

大舟晃平, 岩田亮一, 林美樹夫, 羽柴哲夫, 吉村晋一, 埜中正博, 浅井昭雄
グリオーマがん幹細胞における TRPML チャネルの発現解析

第 36 回日本脳腫瘍学会学術集会・小田原・2018 年 12 月

Ofune K, Iwata R, Hayashi M, Yoshimura K, Nonaka M, Asai A

A novel treatment for recurrent glioblastoma after chemoradiotherapy

第 92 回日本薬理学会年会・大阪・2019 年 3 月

Ofune K, Iwata R, Hayashi M, Yoshimura K, Nonaka M, Asai A

The effect of anti-arrhythmic drugs on glioma stem cells.

The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress・Kobe, Japan・2019 年 3 月

Hayashi M, Iwata R, Andharia N, Ofune K, Yoshimura K, Nonaka M, Asai A, Matsuda H

Electrophysiological properties of inwardly rectifying K⁺ channel in glioblastoma stem-like cells.

The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress・Kobe, Japan・2019 年 3 月

Inagaki A, Hayashi M, Andharia N, Matsuda H

Electrogenic K⁺ secretion induced by butyrate in rat rectal colon.

The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress・Kobe, Japan・2019 年 3 月

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 年 3 月

<特許申請・取得状況>

なし

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	神経内科学講座	事業推進者名	日下 博文
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	パーキンソン病モデルラットを用いた大脳基底核神経回路の可塑性の研究		
キ ー ワ ー ド	Parkinson 病、6-OHDA model Rat、Acetylcholine, Real time RT-PCR		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	7 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
日下博文（教授）：研究を統括する。			
金子 鋭（准教授）：研究計画の立案や結果の解析、論文執筆を行う。			
和手麗香（講師）：分担研究者として研究課題全般に取り組む。			
中村正孝（講師）：分担研究者として研究課題全般に取り組む。			
隠岐光彬（助教）：研究を遂行し、データの解析を行う。			
森勢諭（大学院生）：研究を遂行し、データの解析を行う。			
峠理絵（大学院生）：研究を遂行し、データの解析を行う。			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
方法：片側パーキンソン病モデルラットに対してレボドパ持続投与、間欠投与、あるいは間欠投与＋ゾニサミド併用を行い、LID 発症の評価と線条体におけるムスカリン性アセチルコリン M1 および M4 受容体およびニコチン性アセチルコリン受容体α7 およびβ2 サブユニットの mRNA 発現量の変化を定量することにより、ゾニサミドの線条体アセチルコリン系に対する影響を解析した。			
片側パーキンソン病モデルラットに対してレボドパ持続投与、間欠投与、あるいは間欠投与＋ゾニサミド併用を行い、LID 発症の評価と線条体におけるムスカリン性アセチルコリン M1 および M4 受容体およびニコチン性アセチルコリン受容体α7 およびβ2 サブユニットの mRNA 発現量の変化を定量することにより、ゾニサミドの線条体アセチルコリン系に対する影響を解析した。			
結果：片側パーキンソン病モデルラットに対してレボドパを 2 週間持続投与すると LID が生じなかったが、一日二回、二週間のレボドパ間欠投与では LID を発症した。レボドパ間欠投与にゾニサミドを併用すると LID は生じたものの軽症であった。ゾニサミドを併用していないレボドパ持続投与および間欠投与ではムスカリン性アセチルコリン M1 および M4 受容体およびニコチン性アセチルコリン受容体α7 およびβ2 サブユニットの mRNA 発現量には変化がなかったが、ゾニサミドを併用したレボドパ間欠投与群ではいずれの mRNA も減少していた。			
考察：線条体コリン作動性インターニューロンは持続的に発火しており、線条体内でのアセチルコリン濃度は volume transmitter として一定レベルに保たれていると考えられている。			
線条体でのアセチルコリンはドパミン神経の働きに対して前シナプスおよび後シナプスいずれにおいても拮抗的な作用を及ぼしている。すなわち前シナプスではドパミン神経終末に発現しているニコチン性アセチルコリン受容体を介してドパミン放出を一定レベルになるよう調節している。後シナプスでは線条体の直接路中型有棘細胞にムスカリン性アセチルコリン M4 受容体、間接路中型有棘細胞にムスカリン性アセチルコリン M1 受容体が発現しており、前者は抑制的、後者は促進的に作用している。			
コリン作動性インターニューロンの過活動により LID が増強し、ムスカリン受容体拮抗薬を投与すると LID が軽減することがパーキンソン病モデルマウスを用いた実験で報告されている（Ding Y, PNAS 2011）。今回我々の結果ではゾニサミド投与によってアセチルコリン受容体の mRNA が減少しており、これが LID の軽減につながったと考えられる。またゾニサミドの抗パーキンソン作用は、これまで報告された TH 活性化作用やμOR、mGluRs に対する作用などに加えて、線条体におけるアセチルコリン受容体減少作用を介して発揮されている可能性がある。			
ゾニサミドによるアセチルコリン受容体mRNA 発現抑制は、直接的な mRNA 発現抑制によるものか、あるいは T-type カルシウムチャネル拮抗によるコリン作動性インターニューロンの burst firing 抑制を介した二次的なものかについては今後の検討課題である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	神経内科学講座	事業推進者名	日下 博文
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） <u>Oki M</u>, <u>Kaneko S</u>, <u>Morise S</u>, Takenouchi N, Hashizume T, Tsuge A, <u>Nakamura M</u>, <u>Wate R</u>, <u>Kusaka H</u>. Zonisamide ameliorates levodopa-induced dyskinesia and reduces expression of striatal genes in Parkinson model rats. Neurosci Res 2017; 122: 45-50. （査読あり）			
<図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 該当なし			
<学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） <u>Mitsuaki Oki</u>, <u>Satoshi Kaneko</u>, <u>Satoshi Morise</u>, Norihiro Takenouchi, Takanori Hashizume, Ayako Tsuge, <u>Masataka Nakamura</u>, <u>Reika Wate</u>, and <u>Hirofumi Kusaka</u> Zonisamide ameliorates levodopa-induced dyskinesia and reduces expression of striatal genes in Parkinson model rats World Congress of Neurology 2017, Kyoto, 2017 年 9 月 <u>Satoshi Morise</u>, <u>Satoshi Kaneko</u>, <u>Mitsuaki Oki</u>, <u>Masataka Nakamura</u>, Norihiro Takenouchi, <u>Hirofumi Kusaka</u> Zonisamide ameliorates levodopa-induced dyskinesia via reduction of acetylcholine receptor mRNAs 第 59 回日本神経学会学術大会 札幌 2018 年 5 月			
<特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	眼科学講座	事業推進者名	高橋 寛二
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	「眼の老化の病態」 および「光干渉断層血管撮影像の読影根拠」		
キ ー ワ ー ド	ブルッフ膜弾性板、免疫組織学、脈絡膜新生血管、光干渉断層血管撮影、		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 高橋寛二 教授：研究指導 山田晴彦 准教授：研究指導 盛 秀嗣 助教：「眼の老化の病態」研究遂行 中川 和紀 院生：「光干渉断層血管撮影像の読影根拠」 高橋 元 院生：上記 2 研究の研究補助			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 1. 眼の老化の病態 「眼の老化の病態」として、加齢黄斑変性など黄斑部疾患の病態に深くかかわるブルッフ膜における弾性線維の分子構造の変化について研究を行った。具体的にはマウスブルッフ膜弾性板の胎生期から老齢期に至る変化を fibrillin-1, tropoelastin, fibulin-5, LTBP-2 および-4 の 5 種のタンパク質について免疫染色、電子顕微鏡、リアルタイム PCR、を用いて定量的、定性的に評価した。その結果、マウスのブルッフ膜弾性板には上記 5 種のタンパク質がすべて存在することが明らかになった。免疫染色所見は時期によって染色態度に変化がみられ、電子顕微鏡的所見、リアルタイム PCR 所見から、マウスブルッフ膜は生後 3～6 週に成熟することが判明した。また、老齢マウスにおいては脈絡膜新生血管の前駆物質であるドルーゼンが弾性繊維板周囲に沈着することが明らかになった。本研究によって、ブルッフ膜の成熟と老化による組織構造の変化が分子レベルで明らかとなり、様々な黄斑疾患の病態解明に寄与するものと考えられる。 2. 光干渉断層血管撮影像の読影根拠 「光干渉断層血管撮影 optical coherence tomography angiography (OCTA) は、光干渉断層計の原理を利用して造影を行わず眼底の血管構造を撮影できる検査機器として急速に眼科臨床で普及している。本研究では加齢黄斑変性の実験モデルであるマウスレーザー誘発脈絡膜新生血管モデルを用いて、OCTA 像と組織像の相関を確認することによって、OCTA 像の読影根拠を確認する研究を行った。本研究では、新生血管を構成する組織を判別するために、CD31、PDGFR β 、 α -SMA、collagen I に対する免疫染色を行った。結果として、マウス脈絡膜新生血管は OCTA にて高灌流領域として明瞭に検出されたが、OCTA において脈絡膜新生血管周囲にみられる dark halo の部位には PDGFR β 陽性の pericyte-like scaffold が明瞭に観察された。 α -SMA、collagen I の染色態度から、pericyte-like scaffold の線維化によって OCTA 像において新生血管の検出困難な部位を生ずることが判明した。この結果から、OCTA を用いて脈絡膜新生血管を評価する際には、新生血管を取り巻く組織の影響を考慮して読影する必要があると思われる。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	眼科学講座	事業推進者名	高橋 寛二
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 1. Mori H, Yamada H, Toyama K, Takahashi K, Akana T, Inoue T, Nakamura T: Developmental and age-related changes to the elastic lamina of Bruch's membrane in mouse. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.有. https://doi.org/10.1007/s00417-018-4184-5 2.Nakagawa K, Yamada H, Mori H, Toyama K, Takahashi K: Comparison between optical coherence tomography angiography and immunolabelling for evaluation of laser-induced choroidal neovascularization. PLoS ONE.有. doi.org/10.1371/journal.pone.0201958,2018 <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） なし <学会発表> Nakagawa K, Yamada H, Takahashi K: Comparison between optical coherence tomography angiography and immunolabelling for evaluation of laser-induced choroidal neovascularization.Association for Research in Vision and Ophthalmology 2018 Annual Meeting. Honolulu, Hawaii,USA 2018, 4/29-5/3 中川和紀、山田晴彦、高橋寛二：In vivo images vs immunolabelling in laser-induced choroidal neovascularization.第122回 日本眼科学会総会、大阪、2018年4月19日～22日 <特許申請・取得状況> なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	生物学教室	事業推進者名	平野 伸二
所 属 部 門	神経部門		
分担研究課題	神経系形成におけるプロトカドヘリンの機能と役割の解明		
キ ー ワ ー ド	プロトカドヘリン、自閉症、行動解析		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	4 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
平野 伸二（教授） プロトカドヘリンノックアウトマウスの行動解析			
佐藤 泰史（助教） プロトカドヘリンノックアウトマウスの組織解析			
岡野 圭子（講師） プロトカドヘリンノックアウトマウスの組織解析			
林崎 俊伍（学部学生） プロトカドヘリンの発現と分布の解析			

研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）

本研究は、自閉症関連遺伝子であるプロトカドヘリン分子群の神経系における役割と精神疾患との関連をノックアウトマウスを用いて解明することを目的とし、H28 年度から研究を継続している。

1) 自閉症関連遺伝子プロトカドヘリン9の解析

まず、プロトカドヘリン9ノックアウトマウスの解析では、脳室が大きくなっていることがわかったが、大脳皮質の錐体ニューロンのスパイン形成など脳組織での大きな形態異常は観察できなかった。次に、ノックアウトマウスの行動解析を理化学研究所の若菜成晴博士と古瀬民生博士と共同研究を行い、新奇物体を避けたり、オープンフィールドで中心での滞在時間が短いなど、情動行動の亢進が見られた（図1、2017 年米国神経科学会発表）。

2) プロトカドヘリン1の解析

プロトカドヘリン1のノックアウトマウスにおいても若菜博士らと共同研究で行動解析を行い、社会性が上昇していることや情動性が喚起させる状況での活動量が上昇することが明らかになった（2018 年米国神経科学会発表）。

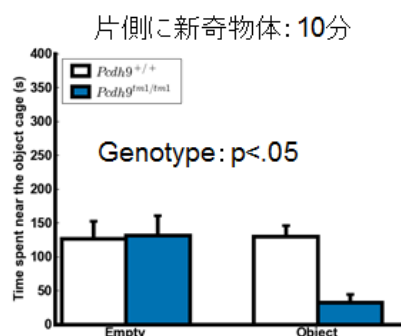


図1 *Pcdh9* KO マウスでは新規物体を避ける

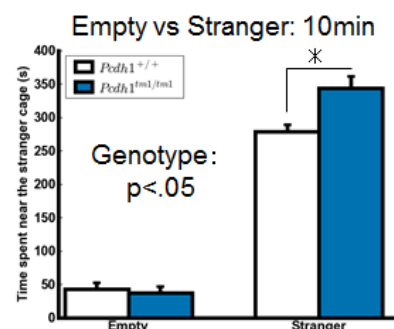


図2 *Pcdh1* KO マウスでは社会性が亢進する

3) 自閉症関連遺伝子プロトカドヘリン10の解析

プロトカドヘリン10については、まず東京医科歯科大学杉原泉教授と小脳における発現パターンについての共同研究を行った。その結果、プロトカドヘリン10がプルキンエ細胞のサブセットに発現し、胎児期のプルキンエ細胞の再編が成体での配列パターンの形成に重要であることがわかった

(Vibulyaseck et al. 2017)。さらに、下オリーブ核から投射からの小脳皮質への投射との相関があることが明らかになった (Sarpong et al. 2018)。また、米国ペンシルベニア大学 Siegel 教授との共同研究では、プロトカドヘリン 10 ヘテロマウスにおいて、GABA を介する興奮/抑制のバランスが異常になり、 γ 波が低下していることが明らかになった (Port et al. 2018)。

4) プロトカドヘリン 11 の解析

理化学研究所と共同研究を行い、ノックアウトマウス (ヘミ接合体) の行動解析を行った。その結果、情動性や社会性の行動には影響なく、暗期の活動性が上昇しているデータが得られた

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	生物学教室	事業推進者名	平野 伸二
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) Sarpong GA, Vibulyaseck S, Luo Y, Biswas MS, Fujita H, <u>Hirano S</u>, Sugihara I. Cerebellar modules in the olivo-cortico-nuclear loop demarcated by pcdh10 expression in the adult mouse. J Comp Neurol. 2018 Oct 15;526(15):2406-2427. (レフェリー有) Port RG, Gajewski C, Krizman E, Dow HC, <u>Hirano S</u>, Brodtkin ES, Carlson GC, Robinson MB, Roberts TPL, Siegel SJ. Protocadherin 10 alters γ oscillations, amino acid levels, and their coupling; baclofen partially restores these oscillatory deficits. Neurobiol Dis. 2017 Dec;108:324-338 (レフェリー有) Vibulyaseck S, Fujita H, Luo Y, Tran AK, Oh-Nishi A, Ono Y, <u>Hirano S</u>, Sugihara I. Spatial rearrangement of Purkinje cell subsets forms the transverse and longitudinal compartmentalization in the mouse embryonic cerebellum. J Comp Neurol. 2017, 525(14):2971-2990 (レフェリー有) <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) <u>Shinji Hirano</u>, Tamio Furuse, Shungo Hayashizaki, <u>Keiko Okano-Imai</u>, Shigeharu Wakana Deficiency of Protocadherin 1 cell adhesion molecule enhances social behavior in mice. Neuroscience 2018 San Diego, USA, Nov.3, 2018, (Annual meeting of Society for Neuroscience) G. A. SARPONG, S. VIBULYASECK, Y. LUO, M. S. BISWAS, H. FUJITA, <u>S. HIRANO</u>, I. SUGIHARA Cerebellar modules in the olivo-cortico-nuclear loop labeled by pcdh10 expression in the adult mouse. Neuroscience 2018 San Diego, USA, Nov.6, 2018, (Annual meeting of Society for Neuroscience) <u>Shinji Hirano</u>, Tamio Furuse, Shigeharu Wakana, Soichi Nagao, Moeko Kudoh, <u>Keiko Okano-Imai</u>, Katsuhiko Yoshizawa Deficient of autism susceptibility gene Protocadherin 9 leads to abnormalities in vestibular response and emotional behavior in mice. Neuroscience 2017 (Annual meeting of Society for Neuroscience) (November 15, Washington, DC, USA) <特許申請・取得状況> なし			

2. がん部門

実験病理学講座	42
微生物学講座	44
分子遺伝学部門	47
モデル動物部門	51
ゲノム編集部門	53
内科学第一講座	55
内科学第三講座	57
外科学講座	59
耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座	64
臨床病理学講座	66

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	実験病理学講座	事業推進者名	上野 博夫
所 属 部 門	がん部門		
分担研究課題	多色細胞系譜追跡法を用いた幹細胞の維持機構の解析		
キ ー ワ ー ド	幹細胞・発生・再生		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	8 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 上野博夫 研究の総括 熊野恵城 幹細胞の単離と遺伝子発現解析 比舎弘子 幹細胞の培養 吉田真子 遺伝子改変マウスの作製 厚海奈穂 ターゲティングベクターの構築 藤田恭平 オルガノイド培養 庄野朱美 オルガノイド培養 エリック・ヨハンソン オルガノイド培養			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 昨年度の研究において、私たちはあらたに舌上皮に存在する味蕾幹細胞の存在を証明した。味蕾とは舌上皮茸状乳頭に存在する味覚感知器官であり、甘味、塩味、苦味、酸味、旨味の基本 5 味覚に加えて、カルシウム、鉄味等のマイナーな味覚を含めすべての味覚を感知する、少なくとも 4 種類の味覚感知細胞を内包している器官である。これらの細胞は聴覚、嗅覚等の感知細胞とは異なり、食物から来る物理的、化学的障害に曝されていることから、成体幹細胞によって維持されていると考えられていた。従来説によると味覚感知細胞の幹細胞は味蕾底部に存在するとされてきたが、私達の研究により、傍味蕾乳頭間窩底部に存在することが明らかとなった。多色細胞系譜追跡法と単一細胞 RNAseq 法を用いて、食道上皮幹細胞、味蕾幹細胞、舌上皮幹細胞の新規幹細胞マーカー遺伝子のリストアップおよび、それに基づいた多色細胞系譜追跡法にて、これらが私達の過去の研究にて同定した幹細胞マーカーよりも特異的であることを示すことができた。また、同領域由来のオルガノイド培養法を確立、多色細胞系譜追跡法、3d タイムラプス動画解析による成体幹細胞の動態解析を行っている。また、同領域の 4NQO 発がんモデルによる腫瘍由来、がんオルガノイド（舌がんオルガノイド、および食道がんオルガノイド）に適応し、正常オルガノイドにおける成体幹細胞の挙動とがんオルガノイドにおけるがん幹細胞の挙動の比較を行い、悪性腫瘍における細胞社会の乱れの意義について解析する。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	実験病理学講座	事業推進者名	上野 博夫
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 1.Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito A T, Harada M, Toko H, Nomura S, Kumagai H, Ikeda Y, <u>Ueno H</u>, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, and Komuro I. Discovery of a Small Molecule to Increase Cardiomyocytes and Protect the Heart After Ischemic Injury Basic to Translational Science 136 2018 2. <u>Yanai H</u>, <u>Atsumi N</u>, <u>Tanaka T</u>, <u>Nakamura N</u>, <u>Komai Y</u>, <u>Omachi T</u>, <u>Tanaka K</u>, <u>Ishigaki K</u>, <u>Saiga K</u>, <u>Ohsugi H</u>, <u>Tokuyama Y</u>, <u>Imahashi Y</u>, <u>Ohe S</u>, <u>Hisha H</u>, <u>Yoshida N</u>, <u>Kumano K</u>, <u>Kon M</u>, <u>Ueno H</u>. Intestinal stem cells contribute to the maturation of the neonatal small intestine and colon independently of digestive activity Scientific reports 7(1) 9891 2017 3. Yan KS, Janda CY, Chang J, Zheng GXY, Larkin KA, Luca VC, Chia LA, Mah AT, Han A, Terry JM, Ootani A, Roelf K, Lee M, Yuan J, Li X, Bolen CR, Wilhelmy J, Davies PS, <u>Ueno H</u>, von Furstenberg RJ, Belgrader P, Ziraldo SB, Ordonez H, Henning SJ, Wong MH, Snyder MP, Weissman IL, Hsueh AJ, Mikkelsen TS, Garcia KC, Kuo CJ. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5⁺ intestinal stem-cell self-renewal. Nature 545(7653) 238-242 2017 4. Xu J, <u>Ueno H</u>, Xu CY, Chen B, Weissman IL, Xu PX. Identification of mouse cochlear progenitors that develop hair and supporting cells in the organ of Corti. Nature communications 8 15046 2017 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 1. 佐藤俊朗, 武部貴則, 永樂元次 編集 <u>上野博夫</u> (担当:共著, 範囲:舌上皮オルガノイド) オルガノイド実験スタンダード 決定版 開発者直伝! 珠玉のプロトコール集 羊土社 2019年4月(執筆2018年) <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1.<u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法による成体幹細胞の同定 (AIを用いた幹細胞・発生研究) 第18回日本再生医療学会 2019年3月 2.<u>上野博夫</u> 味蕾幹細胞の同定とそれを基点とした味覚感知機序の解明・味覚再生技術の確立 (日本再生医療学会賞・基礎部門・受賞者講演) 第18回日本再生医療学会 2019年3月 3.<u>上野博夫</u> 味蕾幹細胞を用いた味覚再生技術開発の可能性 BioJapan2018 2018年10月 4.<u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法によるがん幹細胞の同定 (MorningLecture 10) 第77回日本癌学会学術総会 2018年9月 5.<u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法によるがん幹細胞の同定 (イメージング技術で紐解くがんの特性) 第77回日本癌学会学術総会 2018年9月 6.<u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法による成体幹細胞・がん幹細胞研究 昭和大学 2018年8月 7.<u>上野博夫</u> Cell Community for The Generation of Multifunctional Body-surface 第70回日本細胞生物学会(日本発生生物学会合同大会) 2018年6月 8.<u>上野博夫</u> 舌・食道上皮幹細胞由来正常・異常オルガノイドの単一細胞4D動態・遺伝子発見解析 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「細胞社会ダイバーシティの統合的解明と制御」主催 第二回公開シンポジウム 2018年6月 9.<u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法とシングル・セル RNAseq の融合による成体幹細胞同定 第17回日本再生医療学会総会 2018年3月 10.<u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法を用いた成体幹細胞研究 第1回 個体の中の細胞社会学セミナー 2017年9月 11.<u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法を用いた成体幹細胞同定 第35回耳鼻咽喉頭科ニューロサイエンス研究会 2017年8月 <特許申請・取得状況> 1.舌上皮幹細胞とそれに由来する細胞塊 特許、2018-055301 2018年出願			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	微生物学講座	事業推進者名	藤澤 順一
所 属 部 門	がん部門		
分担研究課題	HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた ATL 発症過程の解析		
キ ー ワ ー ド	HTLV-1, ATL, NSG-SCID, ヒト化マウス		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	8 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者の役割や大学院生の状況等） 藤澤順一(教授)：研究の統括 竹之内徳博(准教授)：統計解析 上野孝治(助教)：HTLV-1 遺伝子の機能解析 大高時文(助教)：HTLV-1 感染ヒト化マウスにおけるウイルス遺伝子の発現解析 中嶋伸介(助教)：HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける免疫機能の解析 Ancy Joseph(特別研究員)：HTLV-1 遺伝子の in vivo 機能解析 姚 錦春(特別研究員)：HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける宿主遺伝子の発現解析 任 翊華(大学院生)：HTLV-1 感染ヒト化マウスにおけるウイルス遺伝子の発現制御			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 微生物講座ではこれまで、NSG-SCID 免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植した「ヒト化マウス」を作製し、これに HTLV-1 を感染させることで ATL 様の病態を再現することに成功した。 HTLV-1 の二種類の発がん遺伝子 Tax と HBZ が、ATL 発症に関与することが示唆されていることから、ヒト化マウス脾臓内 HTLV-1 感染 T 細胞における、遺伝子発現の経時的变化を解析したところ、Tax の発現は感染初期（3 週以内）においては有意な量が観察されたが、それ以降、経時的に減少し、感染 4 ヶ月以降には十分の 1 以下になった。一方、Tax 遺伝子の相補鎖にコードされる HBZ 遺伝子は、逆に経時的に発現が増強した。さらに、高感度 in situ hybridization 法(Prime-Flow RNA assay)を用い、両遺伝子の発現を細胞レベルで解析したところ、細胞あたりの Tax 発現量および発現細胞数は経時的に減少したのに対し、細胞あたりの HBZ 発現は上昇する傾向にあったことから、抗 Tax 細胞障害性 T 細胞の発現誘導に伴い、Tax 発現細胞が感染個体から排除されるのに代わり、HBZ 発現細胞が感染細胞の主要な部分を占めるようになったと解釈された。 ATL 白血病細胞のゲノム解析から、免疫チェックポイント分子PD-L1の発現異常を介した宿主免疫の阻害によりATLの発症が促進される可能性が示唆された。そこで、個体レベルでの HTLV-1感染細胞の腫瘍増殖制御における免疫チェックポイント分子の関与を明らかにする為、HTLV-1感染ヒト化マウスへの抗PD-1抗体の投与効果を検討した。その結果、抗体非投与対象群は2ヶ月以内に白血病死したが、抗PD-1抗体投与群では白血病死する個体はなかった。そこで、抗腫瘍細胞の中心と考えられるCD8陽性Tリンパ球の動態を解析したところ、感染CD4Tリンパ球の腫瘍性増殖に対応して、対照群ではCD8陽性Tリンパ球の数も十～数百倍の増加を示し、宿主免疫応答の活性化が観察されたが、抗PD-1抗体投与群においては、CD8陽性Tリンパ球の増加は最大20倍に留まり、CD8/CD4比は対照群と比較して低値であった。この結果は、抗PD-1抗体の投与によりCD8陽性Tリンパ球の細胞あたりのCTL活性が上昇したと解釈され、PD-1/PD-L1免疫チェックポイントシグナルを介したCTL活性の抑制が、個体レベルでのHTLV-1感染細胞の腫瘍性増殖に関与している可能性が強く示唆された。 今後、免疫チェックポイントの阻害による感染細胞抑制機構の詳細を、各種サイトカイン産生等を指標とした細胞障害性T細胞活性および非感染CD4T細胞や樹状細胞の活性を組織・細胞レベルで明らかにすることが必要であり、また、抗腫瘍剤や抗Taxワクチンとの併用効果の検証に興味を持たれる。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	微生物学講座	事業推進者名	藤澤 順一
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 1. Rie Furuta, Jun-ichirou Yasunaga, Michi Miura, Kenji Sugata, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, <u>Takaharu Ueno</u>, <u>Norihiro Takenouchi</u>, <u>Jun-ichi Fujisawa</u>, Masakazu Shimizu, Fumihiko Matsuda, Anat Melamed, Charles R Bangham, Masao Matsuoka. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. PLOS Pathogens, 査読有, vol.13, e1006722, 2017 2. M.Miwa, C. Ida, S. Yamashita, M. Tanaka, <u>J. Fujisawa</u>. Poly(ADP-ribose): Structure, Physicochemical Properties and Quantification In Vivo. Curr. Protein Pept. Sci., 査読有, vol.117, 683-692, 2016 3. Taka-aki Takeda, Machiko Sasai, Yuka Adachi, Keiko Ohnishi, <u>Jun-ichi Fujisawa</u>, Shingo Izawa, Shigeru Taketani. Biochem. Potential role of heme metabolism in the inducible expression of heme oxygenase-1. Biochem. Biophys. Acta, 査読有, vol.1861, 1813-24, 2017 4. <u>Jinchun Yao</u>, Masakazu Tanaka, <u>Norihiro Takenouchi</u>, <u>Yihua Ren</u>, Sung-il Lee, <u>Jun-ichi Fujisawa</u>. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase in HTLV-I-infected humanized mice. Experimental and Therapeutic Medicine, 査読有, vol.17, 3701-08, 2018 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) <u>Jun-ichi Fujisawa</u>, Springer Japan KK, Chapter 2. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1), <i>Adult T-cell Leukemia/Lymphoma</i> (eds. T. Watanabe and T. Fukushima), 2017, p.3-31 in p.1- 169 <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1. Joseph A, <u>Ueno T</u>, <u>Ren Y</u>, <u>Yao J</u>, Lee S, Tanaka M, <u>Fujisawa J</u> : Both HBZ Protein and mRNA are Required for Leukemic Growth of HTLV-I-infected Tcells in Humanized Mouse Model. 18th International Conference on Human Retrovirology, Tokyo, Japan, 2017 年 3 月 2. Tanaka M, <u>Ren Y</u>, <u>Yao J</u>, Lee S, <u>Takenouchi N</u>, <u>Fujisawa J</u> : Effect of Adjuvant in the Tax Vaccination of Humanized Mouse to Prevent HTLV-I Infection. 18th International Conference on Human Retrovirology. Tokyo, Japan, 2017 年 3 月 3. <u>Takenouchi N</u>, <u>Tanaka M</u>, <u>Fujisawa J</u> : Establishment of an in vitro HTLV-I Infection Model Via Dendritic Cells. 18th International Conference on Human Retrovirology, Tokyo, Japan, 2017 年 3 月 4. Furuta R, Yasunaga J, Miura M, Sugata K, Saito A, Akari H, <u>Ueno T</u>, <u>Takenouchi N</u>, <u>Fujisawa J</u>, Koh K, Shimizu M, Matsuda F, Melamed A, Bangham CR, Matsuoka M : HTLV-I Infection in Multiple lineages of Hematopoietic Cells. 18th International Conference on Human Retrovirology, Tokyo, Japan, 2017 年 3 月 5. 大村裕樹、西川瑞希、<u>Ancy Joseph</u>、<u>上野孝治</u>、<u>藤澤順一</u> : 標的細胞との細胞接着による感染細胞プロウイルスの活性化、第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、枚方、2017 年 8 月 6. 西川瑞希、大村裕樹、<u>上野孝治</u>、田中勇悦、<u>藤澤順一</u> : 抗 HTLV-1 抗体による HTLV-1 感染の活性化、第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、枚方、2017 年 8 月 7. 田中正和、福原貴太郎、竹之内徳博、<u>任 翊華</u>、<u>姚 錦春</u>、李 成一、植田祥啓、木梨達雄、<u>藤澤順一</u> : HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた感染予防ワクチンにおける組織病理学的検討。第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、枚方、2017 年 8 月 8. <u>上野孝治</u>、<u>Ancy Joseph</u>、<u>任 翊華</u>、<u>姚 錦春</u>、李 成一、田中正和、<u>藤澤順一</u> : 個体レベルでの感染における HBZ 遺伝子産物の機能解析。第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、枚方、2017 年 8 月 9. Masakazu Tanaka, Takataro Fukuhara, Sung-il Lee, <u>Yihua Ren</u>, <u>Jinchun Yao</u>, <u>Norihiro Takenouchi</u>, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi, <u>Jun-ichi Fujisawa</u> : Effects of Tax vaccine adjuvants in HTLV-1 humanized mice. 第 76 回日本癌学会学術集会、横浜、2017 年 9 月 10. <u>Takaharu Ueno</u>, <u>Ancy Joseph</u>, <u>Yuihua Ren</u>, <u>Jinchun Yao</u>, Sung-Il Lee, Masakazu Tanaka and <u>Jun-ichi Fujisawa</u> : Analysis of HBZ gene product function in HTLV-1 infected mouse model. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 11. 松尾美沙希、<u>上野孝治</u>、宮里パオラ、勝屋弘雄、徳永雅仁、野坂生郷、宇都宮興、<u>藤澤順一</u>、佐藤賢文 : HTLV-1 内に存在する新規エンハンサー領域の分子メカニズム解析、第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2018 年 8 月 12. <u>上野孝治</u>、<u>ジョセフ アンシー</u>、松永智子、<u>大高時文</u>、<u>任翊華</u>、<u>姚錦春</u>、李成一、梁明秀、<u>藤澤順一</u> : HTLV-1 感染ヒト化マウスへの抗 PD-1 抗体投与による感染細胞の増殖抑制、第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2018 年 8 月 13. Misaki Matsuo, <u>Takaharu Ueno</u>, Paola Miyazato, Hiroo Katsuya, Masahito Tokunaga, Kisato Nosaka, Atae Utsunomiya, <u>Jun-ichi Fujisawa</u>, Yorifumi Satou : Molecular characterization of a new HTLV-1 enhancer. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月 14. <u>Tokifumi Odaka</u>, <u>Yiha Rin</u>, <u>Jinchen Yao</u>, Sung-il Lee, <u>Jun-ichi Fujisawa</u> : ヒト化マウス			

HTLV-1 感染過程における Tax および HBZ の発現変化、第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	分子遺伝学部門	事業推進者名	木梨 達雄
所 属 部 門	がん部門		
分担研究課題	リンパ節のホーミングの分子機構に関する研究		
キ ー ワ ー ド	ケモカイン、抗原受容体、インテグリン、細胞移動		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	6 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 木梨達雄・教授（研究統括） 植田祥啓・講師（胸腺内動態） 上岡裕治・講師（リンパ球動態） 近藤直幸・助教（免疫シナプス） 池田幸樹・助教（薬剤探索）H30 年 10 月入職 福原貴太郎・研究医員（リンパ球動態）			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） Rap1 によって制御される T 細胞動態はその分化・成熟、抗原認識やホーミングに重要な役割を果たしている。Rap1 欠損による胸腺の制御性 T 細胞の産生低下にはインテグリン依存的な接着動態の異常が関与する可能性がある。そこで Rap1 欠損マウスから胸腺 CD4 単陽性 T 細胞を単離して蛍光ラベルし、胸腺スライスに導入して髄質における動態を 2 光子励起レーザー顕微鏡によるライブイメージングにより測定した。その結果、Rap1 欠損マウス由来の CD4 単陽性 T 細胞は野生型に比べ移動速度が低下し、また、移動の直線性が失われていた。末梢の T 細胞の動態をリンパ節スライスの系によって検討したところ、胸腺細胞と同様の結果が得られた。したがって Rap1 欠損胸腺および末梢 T 細胞は動態異常による抗原探索の効率の低下が起こっていると考えられる。 リンパ節へのホーミングに関しては、Rap1 シグナルの下流因子である Kindlin-3, Talin-1 についても解析を行った。Rap1a/Rap1b ダブル欠損、Kindlin-3 欠損、または Talin-1 欠損 T 細胞を用いてリンパ節スライス内での局在解析および各種リンパ組織における細胞組成解析を行った。Kindlin-3 欠損 T 細胞はリンパ節 HEV で arrest する割合が野生型の約 3 割である一方、Rap1a/Rap1b ダブル欠損および Talin-1 欠損 T 細胞は HEV で arrest（停止）する割合が野生型の約 1 割以下であることが判明した。さらにホーミングを再構成する in vitro 実験系では、Rap1a/Rap1b ダブル欠損、Kindlin-3 欠損、Talin-1 欠損 T 細胞でローリングは正常であるが、arrest ができないことが判明した。 リンパ節内での T 細胞-抗原提示細胞間における抗原認識過程への影響を調べる目的で、抗原提示細胞を模した平面脂質二重膜と、LFA-1 細胞内領域の Talin-1 結合部位変異体ノックイン T 細胞や Kindlin-3 ノックアウト細胞を用いた免疫シナプス解析を行った。その結果 Talin-1,Kindlin-3 の LFA-1 への結合阻害により免疫シナプスの形成は低下することが明らかになった。またこれらの T 細胞を用いて LFA-1-ICAM-1 相互作用の免疫シナプス上での一分子結合時間計測を行ったところ、Talin-1, Kindlin-3 は LFA-1-ICAM-1 の結合時間の長期化と頻度の上昇に寄与していることが解明された。 Talin-1 によるインテグリン活性化機序の詳細を調べるために Talin-1/インテグリン間結合を阻害する薬剤の探索を行なった。Talin-1/インテグリン複合体の構造情報に対して、結合部位特異的に結合可能な薬剤分子について in silico ドッキングシミュレーションを行い、複数の候補薬剤分子を選出した。それらの薬剤について大阪歯科大学・牧田講師の助力の下、薬剤合成を行い、その効果について LFA-1 を発現させた Ba/F 細胞を用いて ICAM-1 への接着能を検証した。結果、2 種の薬剤において細胞の接着能が減退したことから、これらの薬剤は Talin-1/インテグリン間の結合を阻害する薬剤である可能性が示唆された。今後は、本薬剤が Talin-1/インテグリン間の結合に直接作用していることを示した上で、薬剤による Talin-1/インテグリン結合急性阻害においてインテグリン活性化がどのように変化するかについて解析する。			

優れた成果があがった点

1. Ex vivo の動態観察により、胸腺・末梢ともに Rap1a/Rap1b ダブル欠損 T 細胞の移動の異常が認められ、よって Rap1 が T 細胞の移動に重要な役割があることが直接明らかとなった。
2. Rap1a/Rap1b ダブル欠損 T 細胞、Kindlin-3 欠損 T 細胞、Talin-1 欠損 T 細胞の解析によって、Rap1 シグナルがリンパ球ホーミングでの停止過程に必須であることが明らかになった。また in vivo の解析から Kindlin-3、Talin-1 の機能には違いがあることがわかった。
3. Talin-1 と Kindlin-3 が LFA-1 に直接作用し LFA-1-ICAM-1 相互作用の長さと頻度を直接結合することにより LFA-1 の活性化を行うことが解明された。またこの活性化により免疫シナプスの形成が促進されていることが示された
4. Talin-1/インテグリン間の結合を阻害する可能性の高い薬剤候補群が得られた。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	分子遺伝学部門	事業推進者名	木梨 達雄
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) (原著) 1. Y Konishi, K Terai, Y Furuta, H Kiyonari, T Abe, <u>Y Ueda</u>, <u>T Kinashi</u>, Y Hamazaki, A Takaori-Kondo, M Matsuda, Live-Cell FRET Imaging Reveals a Role of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activity Dynamics in Thymocyte Motility, <i>iScience</i>, Volume 10, 21 December 2018, Pages 98-113 レフェリー有 2. D Bogdanova, A Takeuchi, M Ozawa, Y Kanda, M. A. Rahman, B Ludewig, <u>T Kinashi</u> and T Katakai, Essential Role of Canonical NF-κB Activity in the Development of Stromal Cell Subsets in Secondary Lymphoid Organs, <i>J. Immunol.</i> December 15, 2018, 201 (12) 3580-3586 レフェリー有 3. Konagaya Y, Terai K, Hirao Y, Takakura K, Imajo M, <u>Kamioka Y</u>, Sasaoka N, Kakizuka A, Sumiyama K, Asano T, Matsuda M A Highly Sensitive FRET Biosensor for AMPK Exhibits Heterogeneous AMPK Responses among Cells and Organs, <i>Cell reports</i> 2017 21(9):2628-2638 レフェリー有 4. Mouri Y, <u>Ueda Y</u>, Yamano T, Matsumoto M, Tsuneyama K, <u>Kinashi T</u>, Matsumoto M, Mode of Tolerance Induction and Requirement for Aire Are Governed by the Cell Types That Express Self-Antigen and Those That Present Antigen, <i>J. immunol.</i>, 2017 199(12):3959-3971 レフェリー有 5. <u>Kondo N</u>, <u>Ueda Y</u>, Kita T, Ozawa M, Tomiyama T, Yasuda K, Lim DS, <u>Kinashi T</u>. NDR1-dependent regulation of kindlin-3 controls high-affinity LFA-1 binding and immune synapse organization. <i>Mol Cell Biol.</i> 2017 Jan 30. pii: MCB.00424-16. doi: 10.1128/MCB.00424-16. [Epub ahead of print] レフェリー有 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 該当なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1. <u>T Kinashi</u>, Roles of Rap1 signaling in immunodeficiency and autoimmunity. The 9th Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases (ACPID) Dec 2nd. 2018. Fukuoka. (国際学会 招待講演) 2. <u>T Kinashi</u>, <u>N Kondo</u>, <u>Y Ueda</u>, <u>Y Kamioka</u>, Rap1 signaling to NDR1 kinase regulate immune synapse formation and cell polarity. The 9th Xiamen Winter Symposium, The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease Nov.2-5 2018. Xiamen. China. (国際学会 招待講演) 3. <u>Y Ueda</u>, <u>N Kondo</u>, <u>Y Kamioka</u> and <u>T Kinashi</u>, Regulation of cell polarization by NDR1 and Rab8 upon chemokine stimulation. The 9th Xiamen Winter Symposium, The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease Nov.2-5 2018. Xiamen. China. (国際学会 ポスター発表) 4. <u>N Kondo</u>, <u>T Kinashi</u>, LFA-1 を介したリンパ球細胞接着の一分子解析 (3P-0061) 分子生物学会, 2018 . Nov. 28-30 Yokohama 5. <u>Y Ueda</u>, <u>N Kondo</u>, <u>Y Kamioka</u>, T Kinashi, W747 talin1 binding site in cytoplasmic domain of the integrin beta2 subunit is crucial for Tcell migration and activation (2-A-WS14-2-O/P), The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2018 . Dec 10-12 Fukuoka 6. <u>Y Kamioka</u>, <u>Y Ueda</u>, <u>N Kondo</u>, <u>T Kinashi</u>, Roles of Rap1, Talin-1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes (2-A-WS14-4-O/P), The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2018. Dec 10-12 Fukuoka 7. <u>T Fukuhara</u>, Intravital observation system of the colon by two photon excitation microscopy, Inflammatory Bowel Diseases 2018 - 13th Congress of ECCO, 2018 Feb. Vienna, Austria 8. <u>Kondo N</u>, <u>Ueda Y</u>, <u>Kinashi T</u>, NDR1 acts as a molecular hub for the organization of			

immunological synapse (3-I-W42-12-O/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

9. Ueda Y, Kondo N, Kamioka Y, Kinashi T, Regulation of cell polarization by Rap1 via NDR/Rab8 axis upon chemokine stimulation(1-G-W13-21-P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.
10. Kamioka Y, Ueda Y, Kondo N, Kinashi T, Roles of Rap1 and Kindlin-3 in lymphocyte homing to peripheral lymph nodes (3-I-W42-10-O/P), The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017. 12.12-12.14 Sendai.

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講座等名	モデル動物部門	事業推進者名	李 成一
所属部門	がん部門		
分担研究課題	病態モデル遺伝子改変マウスの作製および維持、保存に関する研究		
キーワード	遺伝子改変マウス、ES 細胞、CRISPR/Cas9、体外成熟卵子		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	2 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
李成一（准教授）遺伝子改変マウスの作製および解析			
西村愛美（助教）遺伝子改変マウスの作製および解析			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
様々な病態モデルに対応するために、多くの遺伝子改変マウスが作成され、研究に使用されている。遺伝子改変マウスの使用には、内在性タンパクの動態を探るためのマーカー遺伝子を付随するものや、遺伝子の KO によりその分子動態の制御機構を探るなど、様々である。現在までに、本部門では、リンパ球のインテグリン活性化の制御に関わる分子について解析を行う為の遺伝子改変マウスの作成を主に行ってきた。特に、ES 細胞を用いた遺伝子改変マウスの作成では、Rap1 の活性化因子である C3G や RasGRP2 を部位特異的にノックアウトするキメラマウスの作成および生殖系列への寄与に成功し、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた KO マウスの作成にも着手し、Sipa1 の KO マウス作製を行ってきた。 平成 29・30 年度は、現在までに作出してきたマウスの保存と再生に注力してきた。限られた飼育室において、通常の交配を用いて実験に使用できるだけの動物を作成するにはスペースも時間も足りない。必要な時期に必要な匹数の実験動物を供給する手段として、胚・配偶子の凍結保存と、それを生体に戻す作業は必須となっている。本部門では、体外受精などの生殖工学技術を使用して、凍結胚では、のべ 58 系統・3869 個、凍結精子は、のべ 35 系統・223 本のストローを作成し、のべ 49 系統 660 匹の産子を出した。また、遠方より輸送された冷蔵精子を用いたクリーン化においても 2 系統行った。 また、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術によって 1 系統 2 種類を作成している。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術は PX330 plasmid を用いた前核注入法を採用し、前核注入後の生存成績は 59/78 (76%)、生存前核卵子と 2 細胞期まで発生した胚を移植した結果、7/43 (16%)が産子として得られ、そのマウスの尾から、ダイレクトシーケンスによって塩基配列を解析した。その結果、得られた産子の内、2 匹で 1 塩基と 4 塩基の欠損を認め、他部門へと供給した。さらに、多様な疾患モデルマウスの中には、排卵障害を持つものも存在しており、卵巣からの未成熟卵子を体外で受精可能な卵子まで発生させる体外成熟技術を用いた体外受精に関しても研究を進めている。しかしながら、体外成熟培地の確立が不完全な上、体外成熟由来の胚は、胚盤胞期胚および産子への発生成績が未だ低率であることから、体外成熟培地の調整による発生成績の改善を行っており、L-carnitine の添加により胚盤胞期への発生成績の向上が確認された。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	モデル動物部門	事業推進者名	李 成一
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 該当なし <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 該当なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 田中正和、福原貴太郎、竹野内徳博、任翊华、姚錦春、<u>李成一</u>、植田祥啓、木梨達雄、藤澤順一； HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた感染予防ワクチンにおける組織病理学的検討. 第4回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2017 年 8 月 18 日～20 日(大阪) 小木曾力、折杉卓哉、東里香、小橋朱里、<u>西村愛美</u>、野田義博、中川隆生、小笠原里奈、鷺津朱理、細井美彦、松本和也、安齋政幸. β-NMN 添加修正 TaM 培地が体外成熟由来卵子の遺伝子発現に与える影響. 第64回日本実験動物学会総会. 福島県郡山市. 2017 年 5 月 25-27 日 小笠原里奈、小橋朱里、東里香、<u>西村愛美</u>、野田義博、中川隆生、小木曾力、鷺津朱理、細井美彦、松本和也、安齋政幸. L-carnitine 添加 mTaM 培地がマウス体外成熟由来卵子における Cpt2 遺伝子に与える影響. 第64回日本実験動物学会総会. 福島県郡山市. 2017 年 5 月 25-27 日 Masayuki Anzai, Rika Azuma, <u>Manami Nishimura</u>, Yoshihiro Noda, Akari Obashi, Rina Ogasawara, Akari Washizu, Chikara Kogiso and Yoshihiko Hosoi. Effect of in vitro maturation medium containing L-carnitine on gene expression during in vitro maturation of mouse embryos. The Forth World Congress of Reproductive Biology. 沖縄県宜野湾市. 2017 年 09 月 27-29 日 安齋 政幸、<u>西村 愛美</u>、小木曾 力、東 里香、小笠原 里奈、鷺津 朱理、野田 義博、中川 隆生、細井 美彦. マウス体外成熟培地への L-カルニチン添加が卵子細胞質内脂質代謝酵素遺伝子群に及ぼす影響. 第51回日本実験動物技術者協会総会. 山形県山形市. 2017 年 10 月 12-14 日 小木曾力、<u>西村愛美</u>、東里香、中川隆生、小笠原里奈、鷺津朱理、松本淳希、森脇奈央、安齋政幸. 体外成熟培養中の L-Carnitine は胚発生時の脂肪酸代謝関連遺伝子を安定化させる. 第40回日本分子生物学会年会. 兵庫県神戸市. 2017 年 12 月 6-9 日. 小笠原里奈、東里香、<u>西村愛美</u>、中川隆生、小木曾力、鷺津朱理、松本淳希、森脇奈央、安齋政幸. マウス初期二次卵胞を用いた新たな体外発育操作と代謝酵素遺伝子の活性化の検討. 第40回日本分子生物学会年会. 兵庫県神戸市. 2017 年 12 月 6-9 日. 上野孝治、ジョセフアンシー、松永智子、大高時文、任翊华、姚錦春、<u>李成一</u>、梁明秀、藤澤順一； HTLV-1 感染ヒト化マウスへの抗 PD-1 抗体投与による感染細胞の増殖抑制. 第5回日本 HTLV-1 学会学術集会. 2018 年 8 月 31 日～9 月 2 日(東京) Tokifumi Odaka, Yiha Rin, Jinchun Yao, <u>Sung-il Lee</u> and Jun-ichi Fujisawa. Alternate expression of Tax and HBZ genes in the course of HTLV-1 infection in humanized mouse. 第66回日本ウイルス学会学術集会. 2018 年 10 月 28 日～30 日 (京都) <u>西村愛美</u>、小木曾力、東里香、中川隆生、安齋政幸. 体外成熟培養中の L-carnitine が胚発生時の脂肪酸代謝遺伝子の活性を促進する. 第65回日本実験動物学会総会. 富山県富山市. 2018 年 5 月 16 日 森脇奈央、<u>西村愛美</u>、東里香、松本淳希、中川隆生、細井美彦、安齋政幸; 脱イオン化 AlubMAX 添加培地がマウス体外成熟由来卵子への胚発生に与える効果. 第65回日本実験動物学会総会. 富山県富山市. 2018 年 5 月 16 日 安齋政幸、<u>西村愛美</u>、東里香、中川隆生、松本和也. マトリゲル包埋による成熟マウス由来初期二次卵胞を用いた体外発育操作と評価. 第52回日本実験動物技術者協会総会. 熊本県熊本市. 2018 年 10 月 4 日 <特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講座等名	ゲノム編集部門	事業推進者名	福田 尚代
所属部門	がん部門		
分担研究課題	GFP ノックイン細胞を用いた細胞極性制御因子の時空間的発現解析		
キーワード	CRISPR/Cas9, exocyst, vesicle tethering		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	2 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 本研究課題は福田尚代が研究全体の遂行および総括を担う。徳弘圭造氏は実験結果の分析を行う。			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） Exocyst は Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84 の 8 つのタンパク質から構成される複合体であり、exocytosis において分泌小胞を細胞膜へ繫留する因子である。これまでに exocyst の機能解析は主に出芽酵母で進められてきており、哺乳類の exocyst の機能は不明な点が多い。哺乳類細胞株では、exocyst subunit を過剰発現させると、タンパク質分解や局所異常を誘起するため、exocyst の細胞内局在変化を解析することは困難であった。そこで、マウス乳腺細胞 NMuMG を用いて CRISPR/Cas9 により exocyst subunit の C 末端領域に sfGFP, mScarlet, Halo を挿入したノックイン細胞を樹立し、生細胞内での 5 つの内在性 exocyst subunit の可視化に成功した。樹立したノックイン細胞株を用いて高速撮影可能な全反射照明顕微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF)により分泌小胞融合前後の内在性 exocyst subunit の挙動を詳しく解析した。その結果、(1) exocyst は 2 つの subcomplex から成り立っており、各々の subcomplex は細胞膜への移動能を持つこと、(2) 2 つの subcomplex の細胞膜への到達時間には極僅かな違いがあること、(3) Sec3 は小胞融合前に他の subunit から解離すること、(4) Single molecule counting 解析により、融合時には 1 つの分泌小胞に対して約 9 つの exocyst 複合体が存在することが明らかになった。本研究は、ゲノム編集技術を用いることで、哺乳類細胞における内在性 exocyst のダイナミクスを定量的に解析したものであり、exocyst 複合体の解離を捉えた初めての研究報告である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	ゲノム編集部門	事業推進者名	福田 尚代
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 1. Ahmed SM*, <u>Nishida-Fukuda H*</u>, Li Y, McDonald WH, Gradinaru CC and Macara IG. Exocyst dynamics during vesicle tethering and fusion. <i>Nature Communications</i> 査読あり、9, Article number: 5140 (2018). *These authors contributed equally to this work. 2. <u>Tokuhiro K</u>, Dean J. Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. <i>Developmental Cell</i>. 査読あり 46(5):627-640. 2018. <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 1. <u>Tokuhiro, K</u>, Dean, J. Elsevier. The Zona Pellucida Facilitates Fertilization, Blocks Polyspermy and Protects Pre-Implantation Embryos. In M. K. Skinner (Ed.), Encyclopedia of Reproduction. vol. 3, 2018, pp. 294–299. <学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） 1. 福田尚代, Syed Mukhtar Ahmed, Ian G. Macara 「CRISPR/Cas9 システムを利用した内在性 exocyst のイメージング解析」第 59 回 日本生化学会 中国・四国支部例会, 米子 2018.5.27 2. <u>Hisayo Nishida-Fukuda</u>, Syed Mukhtar Ahmed and Ian G. Macara 「Dynamics of the Exocyst Complex During Vesicle Tethering and Fusion」PIM2018 第 16 回 松山国際学術シンポジウム Matsuyama, 2018.9.11 3. 福田尚代, Syed Mukhtar Ahmed, Ian G. Macara 「TIRF 顕微鏡による内在性 exocyst のリアルタイムイメージング」第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018.11.29 <特許申請・取得状況> 該当なし			

※適宜、行を追加してください。

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	内科学第一講座	事業推進者名	野村 昌作
所 属 部 門	がん部門		
分担研究課題	ヒト樹状細胞によるさまざまな病態関連応答の解明と新たな難病治療戦略の開発		
キ ー ワ ー ド	GVHD, GM-CSF, 制御性 T 細胞、樹状細胞、レナリドミド、 IFN-α		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 野村昌作 主任教授 伊藤量基 大学院生指導教官：准教授 佐竹敦志 大学院生指導教官：講師 堀田雅章 助教 木畑佳代子 助教			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) は、治療の成否を左右する重要な合併症である。 今回、われわれは慢性 GVHD マウスモデルを用いて、GM-CSF による制御性 T 細胞(regulatory T cell; Treg)増殖を介した新規治療法の開発を目指し、研究を行なった。GM-CSF 投与により樹状細胞(Dendritic cell; DC)のサブセット変化と Treg が増殖を認め、皮膚慢性 GVHD の軽減を確認することができた。サイトカインの解析の結果から、GM-CSF により誘導された DC からの刺激を受けた Treg が、GVHD の病態形成に重要な IL-17 産生 T 細胞の増加を抑制するという機序が推測された。 Treg は GVHD の細胞療法源としても注目を浴びており、今回の結果から GM-CSF による生体内 Treg 増殖は治療選択肢として有望であると考えられた。 多発性骨髄腫（multiple myeloma; MM）の新規治療薬としてレナリドミドやボマリドミドといった免疫調節薬（IMiDs）が非常に優れた治療成績をもたらしている。しかしながら、IMiDs の抗腫瘍免疫作用機序はエフェクター細胞に対する作動は一部確認されているが、その多くは未解明である。エフェクター細胞の上位に位置し、自然免疫と獲得免疫いずれをも制御する樹状細胞(Dendritic cell:DC)に対する作用機序の解明を目的として検討した。臨床的血中濃度のレナリドミドは CpG-刺激 pDC の持つ IFN-α 産生能を維持増強することを確認した。一方、骨髄腫治療に使用するプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブはむしろ IFN-α産生能を抑制した。この結果からレナリドミド投与時ではウィルス感染に強い状態と考えられ、ヘルペス感染リスクの高い患者に対しては、ボルテゾミブよりレナリドミド使用が現実的な選択肢として推奨されることが理解できる。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	内科学第一講座	事業推進者名	野村 昌作
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) <u>Ito T</u>, Konishi A, Tsubokura Y, Azuma Y, <u>Hotta M</u>, Yoshimura H, Nakanishi T, Fujita S, Nakaya A, <u>Satake A</u>, Ishii K, <u>Nomura S</u>. Combined Use of Ninjin'yoeito Improves Subjective Fatigue Caused by Lenalidomide in Patients With Multiple Myeloma: A Retrospective Study. <i>Frontiers in nutrition</i>. レフェリー有. 2018. 21(5):72-72 <u>Ito T</u>, Nakaya A, Fujita S, <u>Satake A</u>, Nakanishi T, Azuma Y, Tsubokura Y, Konishi A, <u>Hotta M</u>, Yoshimura H, Ishii K, <u>Nomura S</u>. Secondary pure red cell aplasia in multiple myeloma treated with lenalidomide. <i>Leukemia research reports</i>. レフェリー有. 2018. 7;10:4-6 Hotta M, Yoshimura H, Satake A, Tsubokura Y, Ito T, Nomura S. GM-CSF therapy inhibits chronic graft-versus-host disease via expansion of regulatory T cells. <i>Eur J Immunol</i>. レフェリー有. 2019 Jan;49(1):179-191. <u>Kayoko Kibata</u>, <u>Tomoki Ito</u>, Muneco Inaba, Akihiro Tanaka, Ryoichi Iwata, Noriko Inagaki-Katashiba, Phan Thi Xuan Vien, <u>Atsushi Satake</u>, <u>Shosaku Nomura</u>. The immunomodulatory-drug, lenalidomide, sustains and enhances interferon-α production by human plasmacytoid dendritic cells. <i>Journal of Blood Medicine</i>. レフェリー有. In press. <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) <u>伊藤 量基</u>. 北隆館・多発性骨髄腫に対する免疫調節薬(IMiDs)の効果と作用機序. <i>Medical Science Digest</i>. 2018, 5 ページ <u>伊藤 量基</u>. 科学評論社・新規治療薬を含めた骨髄腫に対する長期的な治療戦略 骨髄腫における 1st Phase 治療と Next Phase 治療の意義. <i>血液内科</i>. 2018, 7 ページ <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) Tomoki Ito. Lenalidomide acts as a positive immunomodulator through modulating the functions of human plasmacytoid dendritic cells. 第 59 回アメリカ血液学会. 米国 Atlanta. 2017/12/2 <特許申請・取得状況> なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	内科学第三講座	事業推進者名	岡崎 和一
所 属 部 門	がん部門		
分担研究課題	分子イメージングによる炎症性および腫瘍性消化器病変のバイオマーカー探索		
キ ー ワ ー ド	分子イメージング、幹細胞 粘膜再生 腫瘍 炎症性腸疾患 自己免疫性膵炎		
講座内の本プロジェクト参加研究者数		14 名	
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
1. 炎症性消化器疾患における病態解析とバイオマーカー探索：西尾彰功（准教授）、内田一茂（准教授）、池浦司（講師）安藤祐吾（講師）、富山 尚（助教）,大学院生：柳川雅人、松井芙美			
2. 消化管・膵・肝再生における幹細胞の探索と粘膜再生・発癌メカニズムの解析：福井寿朗（講師）、山口隆志（助教）大学院生：谷村雄志、津久田論、諏訪兼彦、榊田昌隆、中丸光			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
1. 炎症性消化器疾患における病態解析とバイオマーカー探索： IgG4 関連自己免疫性膵炎（AIP）を中心とした IgG4 関連疾患の免疫担当細胞サブセットにおける各 TLR の発現と IgG4 陽性細胞、血中サイトカインの解析を行い、AIP では TLR7 陽性 M2 マクロファージ、TLR2,4 陽性好塩基球が有意に浸潤するとともに、各 TLR リガンドで刺激すると膵炎や唾液腺の発症を認めた。これらから自然免疫系の異常が病態に関与するとともに、重症例では IL-6 が高値であり、疾患重症度のバイオマーカーになる可能性が示唆された。			
2. 消化管・膵・肝再生における幹細胞の探索と粘膜再生・発癌メカニズムの解析： 最新の幹細胞、細胞周期研究の知見や、各消化器疾患モデルマウスの知見を応用することにより、消化管粘膜上皮・膵における有用な新規組織幹細胞マーカーとしてリンカー部スレオニンリン酸化 Smad2/3 蛋白（pSmad2/3L-Thr）を同定した。正常マウス小腸・大腸粘膜や DSS 起因性大腸炎モデル、IL-10 ノックアウトマウス大腸炎・化学自然免疫系の関与を検討するために、発癌大腸癌モデル・セルレイン膵炎といったモデルを作製し、pSmad2/3L-Thr と Ki-67 の蛍光二重免疫染色法にて同様に組織幹細胞を検出し、組織上皮幹細胞のマーカーとして利用できることを確認した。特に DSS 起因性大腸炎モデル・セルレイン膵炎については pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞を粘膜障害・再生の経過とともに経時的に確認し、活動性病変部では pSmad2/3L-Thr 強陽性幹細胞はほぼ消失しており、再生治癒状況が進行するにつれ消化管では粘膜基底部分では tubular complex における pSmad2/3L-Thr 強陽性幹細胞は著明に増加していた。消化管粘膜には二種類（slow- or rapid- cycling）存在するとされる組織幹細胞のうち、slow-cycling stem cell の特徴に合致すると考えられた。IL-10 ノックアウトマウス大腸炎・大腸癌モデルにおいては pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞の分布を腸炎部、癌部にて観察したが、粘膜が過形成となる腸炎部では pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞が著増していたが、癌部と思われた病変部では pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞はほとんど発現していなかった。内視鏡的に摘出された組織標本（正常消化管粘膜組織や各消化管腫瘍組織）を利用して、同様に pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞を検出する実験により、腫瘍部、脈管浸潤部において pSmad2/3L-Thr 強陽性細胞が散在性に認められた。さらに大腸炎より発生する大腸癌では、これらの異常は粘膜の上部 1 / 3 より発生する頻度が高く、炎症性腸炎の発がんの発症機序の解明に役立つ可能性がある。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	内科学第三講座	事業推進者名	岡崎 和一
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) ・光山 俊行, 内田 一茂, 住本 貴美, 福井 由里, 池浦 司, 福井 寿朗, 西尾 彰功, 四方 伸明, 植村 芳子, 里井 壮平, 水野 伸匡, 能登原 憲司, 下瀬川 徹, ジュセッペ・ザンボーニ, ルカ・フルローニ, 岡崎 和一・1型自己免疫性膵炎(LPSP)と2型自己免疫性膵炎(IDCP)の好中球浸潤の比較・関西医科大学雑誌・不明・69:7-18・2018 ・Okazaki K, Uchida K.・Current Concept of Autoimmune Pancreatitis and IgG4-related Disease.・The American journal of gastroenterology・不明・113(10):1412-1416・2018 ・Ryota H, Ishida M, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Kosaka H, Hirooka S, Yamaki S, Kotsuka M, Matsui Y, Ikeura T, Uchida K, Takaoka M, Okazaki K, Tsuta K.・Clinicopathological and immunological features of follicular pancreatitis-a distinct disease entity characterized by Th17 activation.・Histopathology・あり・45(12):1444-1447・2018 ・Uchida K, Okazaki K.・Clinical and pathophysiological aspects of type 1 autoimmune pancreatitis.・Journal of gastroenterology・不明・53(4):475-483・2018 ・Matsui F, Inaba M, Uchida K, Nishio A, Fukui T, Yoshimura H, Satake A, Yoshioka K, Nomura S, Okazaki K.・Induction of PIR-A/B(+) DCs in the in vitro inflammatory condition and their immunoregulatory function.・Journal of gastroenterology・不明・53(10):1131-1141・2018 ・Okazaki K, Uchida K.・Current perspectives on autoimmune pancreatitis and IgG4-related disease.・Proceedings of the Japan Academy Series B・不明・94(10):412-427・2018 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) ・Kazushige Uchida, Kazuichi Okazaki・Springer・Treatment: Immunomodulatory Drugs・2019年・(4ページ) 109-112 <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) ・岡崎 和一・IgG4 関連疾患の最新の話・第22回 日本肝臓学会大会(JDDW)・神戸・2018/11 ・内田一茂, 柳川雅人, 池宗真美, 津久田諭, 田中敏宏, 富山尚, 山口隆志, 安藤祐吾, 池浦司, 福井寿朗, 西尾彰功, 岡崎和一・1型自己免疫性膵炎における好塩基球.M2 マクロファージの関与・第46回日本臨床免疫学会総会・長野県・2018/11 ・岡崎 和一・教育講演1 自己免疫性膵炎の病態解析と治療の進歩・第49回 日本膵臓学会大会・和歌山市, 和歌山県・2018/06 ・柳川雅人, 内田一茂, 岡崎和一・1型免疫性膵炎(AIP)の病態生理における自然免疫の反応の役割・第49回 日本膵臓学会大会・和歌山市, 和歌山県・2018/06 ・池浦司, 高岡亮, 内田一茂, 島谷昌明, 三好秀明, 光山俊行, 加藤孝太, 堀雄一, 岡崎和一・1型自己免疫性膵炎と慢性膵炎の臨床的・組織学的相違点・第35回日本胆膵病態・生理研究会・名古屋・2018/06 ・内田一茂, 柳川雅人, 岡崎和一・IgG4 関連消化器疾患における現状と課題 1型自己免疫性膵炎における自然免疫の関与・第104回日本消化器病学会総会・東京・2018/04 ・Kazuichi Okazaki・Updates on IgG4 related diseases・APDW2018 (Asian Pacific Digestive Week)・Seoul・2018/11 ・Yanagawa M. Uchida K, Okazaki K・Involvement of Basophils with Type1 Autoimmune Pancreatitis・49th Annual Meeting of the American Pancreatic Association・Miami, USA・2018/11 ・Kazuichi Okazaki・Autoimmune Pancreatitis and IgG4-related disease・Taiwan Digestive Disease Week・Taiwan・2018/09 ・Toshihiro Tanaka, M.Eric Gershwin, Kazuichi Okazaki・The environmental xenobiotic modification of PDC-E2 inner lipoyl domain can lead to the loss of tolerance to PDC-E2・GI Research Academy 2018・東京・2018/05 <特許申請・取得状況> なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	外科学講座	事業推進者名	海堀 昌樹
所 属 部 門	①代謝部門、②がん部門		
分担研究課題	①誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）由来の一酸化窒素産生を障害マーカーとした肝臓保護薬剤の解析 ②高分子ミセル化 ICG を用いた癌診断・治療の検討		
キ ー ワ ー ド	①inducible nitric oxide synthase, nuclear factor-κB, rat primary cultured hepatocyte, rat liver injury model②ICG-lactosome、Photodynamic Therapy、Drug Delivery System		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	①17名、②6名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
① 企画 (テーマ、人員構成、財源)(3); 海堀昌樹, 奥村忠芳, 権雅憲 実験と解析(11);三木博和, 中竹利知, 上山庸佑, 菱川秀彦, 松島英之, 中村有佑, 飯田洋也, 坂口達馬, 小塚 雅也, 橋本裕也, 八田雅彦, 考察、論文校正 (6) ;海堀昌樹, 奥村忠芳, 権雅憲, 石崎守彦, 松井康輔, 徳原 克			
② 企画 (テーマ、人員構成、財源)(1); 海堀昌樹 実験と解析(2);菱川秀彦, 津田 匠 考察、論文校正 (4) ;海堀昌樹, 奥村忠芳, 石崎守彦, 松井康輔			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
①レボシメンダン（levosimendan, 急性心不全治療薬）は”カルシウムセンシタイザー”として知られているが、様々な炎症性サイトカインの発現やアポトーシスシグナル経路に影響を与えることより、心臓以外の臓器障害に効果を示すことが推察されている。70%肝切除ラットにリポポリサッカライド(LPS)処理して作成した急性肝不全モデルを用いて、レボシメンダンが生存率を増加させることを報告した。同時に、ラット初代培養肝細胞（in vitro 肝障害）モデルを用いて、TNF-α, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 や誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の発現抑制を介したメカニズムを明らかにした [12]。後者の iNOS の生成物である一酸化窒素（NO）は肝障害マーカーの一つとして、近年よく知られている。[12] Sakaguchi et al. Levosimendan pretreatment improves survival of septic rats after partial hepatectomy and suppresses iNOS induction in cytokine-stimulated hepatocytes. Scientific Reports, accepted 1-9-2019.			
ランソプラゾール（lansoprazole, proton pump 阻害剤）はラット初代培養肝細胞において、iNOS 誘導/NO 産生や TNF-α 発現を“NF-κB 活性化”の阻害を介して抑制した。さらに、D-galactosamine/LPS 処理して作成したラット急性肝障害モデルにおいて、その生存率を亢進した[14]。ランソプラゾールはその治療効果の可能性をさらに模索しなければならないが、肝障害に軽減作用を示すと推測される。			
[14] Nakatake et al. The proton pump inhibitor lansoprazole has hepatoprotective effects in in vitro and in vivo rat models of acute liver injury. Digestive Diseases and Sciences, accepted 4-6-2019.			
②島津製作所で開発された高分子ミセル化 ICG（ICG ラクトソーム）は、血管透過性・滞留性亢進効果から癌部に集積する Drug Delivery System（DDS）ことが可能であり、近赤外線を用いた光線力学療法（Photodynamic Therapy; PDT）を行うことにより抗腫瘍効果を得られる。			
ICG ラクトソームのヒト肝細胞癌のマウスモデルへの腫瘍集積性を確認し、ヒト肝細胞癌のマウスモデル実験において、抗腫瘍効果を示し、温熱効果による腫瘍細胞のアポトーシスを確認した<1>			
[1]Tsuda T, Kaibori M, Hishikawa H, et al. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2017; 31; 12(8): e0183527. doi:			
またヒト胆嚢癌のマウスモデルに対し、ICG ラクトソームの腫瘍集積性を確認。ICG ラクトソームが PDT 後再集積することを発見し、1 回投与で 2 回照射が可能であることを発見した。			
ヒト胆嚢癌のマウスモデル実験において、コントロール群および 1 回照射、2 回照射の抗腫瘍効果を検討し、2 回照射>1 回照射<コントロールで抗腫瘍効果を確認することができた。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	外科学講座	事業推進者名	海堀 昌樹
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 以下論文は全てレフェリー有り			
①			
1. Miki H, Tokuhara K, Oishi M, Tanaka Y, Nakatake R, Ueyama Y, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T, Kon M. Elental® amino acid component has protective effects on primary cultured hepatocytes and a rat model of acute liver injury. Nutrition Research, in press (5-1-2017). <i>Nutrition Research</i> , 2017; 42: 71-84.			
2. Tsuda T, Kaibori M, Hishikawa H, Nakatake R, Okumura T, Ozeki E, Hara I, Morimoto Y, Yoshii, Kon M. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma. <i>PLoS One</i> . 2017 Aug 31;12(8):e0183527.			
3. Fujii A, Okuyama T, Wakame K, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. Identification of anti-inflammatory constituents in phellodendri cortex and coptidis rhizoma by monitoring the activity to suppression of nitric oxide production. <i>J Nat Med</i> . 2017; 71(4): 745-756.			
4. Nakatake R, Hishikawa H, Matushima H, Nakamura Y, Ishizaki M, Matsui K, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T, Kon M. Curcumin protects liver inflammation by suppressing expression of inducible nitric oxide synthase in primary cultured rat hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2017; 7(9); 716-734.			
5. Okuyama T, Nakatake R, Kaibori M, Okumura T, Kon M, Nishizawa M. A sense oligonucleotide to inducible nitric oxide synthase mRNA increases the survival rate of rats in septic shock. <i>Nitric Oxide</i> , 2018; 72: 32-40.			
6. Nakatake R, Kaibori M, Nakamura Y, Tanaka Y, Matushima H, Okumura T, Murakami T, Ino Y, Todo T, Kon M. A third-generation oncolytic herpes simplex virus inhibits the growth of liver tumors in mice. <i>Cancer Res</i> . 2018; 109; 600-610.			
7. Nakatake R, Iida H, Ishizaki M, Matsui K, Nakamura Y, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T. Metformin inhibits expression of the proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2018; 8(3): 175-192.			
8. Nakamura Y, Iida H, Nakatake R, Sakaguchi T, Kaibori M, Okumura T, Hamada Y, Doi T. L-Carnitine has a liver-protective effect through inhibition of inducible nitric oxide synthase induction in primary cultured rat hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2018; 8(3): 212-227.			
9. Nakatake R, Kotsuka M, Hashimoto Y, Hatta M, Ishizaki M, Matsui K, Kaibori K, Nishizawa N, Okumura T. Glutathione inhibits expression of the proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2018; 8(10): 495-509.			
10. Yamauchi Y, Okuyama T, Ishii T, T, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. Sakuranetin downregulates inducible nitric oxide synthase expression by affecting interleukin-1 receptor and CCAAT/enhancer-binding protein β . <i>J Nat Med</i> . 2019; 73(2): 353-368.			
11. Dwijayanti DR, Okuyama T, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. The anti-inflammatory effects of Indonesian and Japanese bitter melon (<i>Momordica charantia</i> L.) fruit extracts on interleukin-1 β -treated hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2019; 9(1): 16-33.			
12. Sakaguchi T, Hashimoto Y, Matsushima H, Hishikawa H, Nishizawa N, Okumura T, Kaibori M. Levosimendan pretreatment improves survival of septic rats after partial hepatectomy and suppresses iNOS induction in cytokine-stimulated hepatocytes. <i>Scientific Reports</i> ; accepted 1-9-2019.			
13. Nishizawa M, Okumura T, Ikeya Y. Assessment of anti-inflammatory effects of Japanese Kampo medicine versus functional foods. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2019; 9(2): 79-91.			
14. Nakatake R, Hishikawa H, Kotsuka M, Ishizaki M, Matsui K, Nishizawa M, Yoshizawa K, Kaibori M, Okumura T. The proton pump inhibitor lansoprazole has hepatoprotective effects in in vitro and in vivo rat models of acute liver injury. <i>Digestive Diseases and Sciences</i> , accepted 4-6-2019.			
15. Ueyama Y, Tokuhara T, Miki H, Nakatake R, Sakaguchi T, Nishizawa M, Kaibori M, Okumura T. AHCC® has protective effects in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. <i>J Surg Res</i> , accepted 5-30-2019.			
16. Hishikawa H, Kaibori M, Tsuda, T, Matsui K, Okumura T, Ozeki E, Yoshii K. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for			

gallbladder cancer. *Oncotarget*, accepted 6-16-2019.

②1.

Tsuda T, Kaibori M, Hishikawa H, et al. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2017; 31; 12(8): e0183527. doi:

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数)

無し

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

①2017 (H29)

1. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Hideyuki Matushima, Yusuke Nakamura, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, A-Hon Kwon.

Curcumin protects liver inflammation by suppressing iNOS induction in rat hepatocytes.

39th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism (Hague, The Netherlands; September 9-12, 2017)

2. Richi Nakatake, Yoshito Tanaka, Yousuke Ueyama, Hirokazu Miki, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Masanori Kon.

Alleviating effect of active hexose correlated compound prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy in rats.

25th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 8-9, 2017)

3. Yukinobu Ikeya, Sayuri Yokoyama, Yuka Yamamoto, Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa.

Constituents in perilla extract inhibit production of nitric oxide in rat hepatocytes.

25th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 8-9, 2017)

4. Dinia R. Dwijayanti, Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya, Mikio Nishizawa. Effects of the Extracts from Indonesian and Japanese Bitter Melons on the Nitric Oxide Production in Hepatocytes.

25th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 8-9, 2017)

5. 山内 優子, 奥山 哲矢, 奥村 忠芳, 池谷 幸信, 西澤 幹雄

ラット初代培養肝細胞におけるオウヒ成分の NF- κ B シグナル伝達経路への影響

第 40 回分子生物学会 (第 90 回日本生化学会) 神戸、12 月 6-9 日、2017.

6. 石井 寿成, 奥山 哲矢, 奥村 忠芳, 池谷 幸信, 西澤 幹雄

ソウジュツ中に含まれる一酸化窒素産生誘導を抑制する成分の探索

第 40 回分子生物学会 (第 90 回日本生化学会) 神戸、12 月 6-9 日、2017.

2018 (H30)

7. Dinia R. Dwijayanti, Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya, Mikio Nishizawa.

The anti-inflammatory effects of Indonesian and Japanese bitter melon (*Momordica charantia* L.) extracts in interleukin-1 β -treated hepatocytes.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

8. Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya.

Assessment of anti-inflammatory effects of Japanese Kampo medicine and functional foods.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

9. Richi Nakatake, Masaya Kotsuka, Yuki Hashimoto, Masahiko Hatta, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.

Glutathione inhibits the expression of proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

10. Yusuke Nakamura, Hiroya Iida, Richi Nakatake, Tsuma Sakaguchi, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Yoshinori Hamada, Takashi Doi.

L-Carnitine inhibits induction of inducible nitric oxide synthase gene expression in hepatocytes.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

11. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Hideyuki Matsushima, Masaya Kotsuka, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Hiroaki Yanagimoto, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.

Curcumin protects liver inflammation by suppressing iNOS induction in rat hepatocytes.

26th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 21-22, 2018)

12. Tetsuya Okuyama, Chisa Takakura, Takae Kamimoto, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya, Mikio Nishizawa.

Effects of the wolfberry (the fruits of *Lycium barbarum*) and their constituent on nitric oxide production in interleukin-1 β treated rat hepatocytes.

26th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 21-22, 2018)

13. Yukinobu Ikeya, Sayuri Yokoyama², Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa.

Constituents in *Perilla* Extract Inhibit Production of Nitric Oxide in Rat Hepatocytes.

26th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 21-22, 2018)

14. Masaya Kotsuka, Richi Nakatake, Yuki Hashimoto, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.
Glutathione inhibits expression of the proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.
40th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism (Madrid, Spain, 1-4 September, 2018)

15. Richi Nakatake, Hiroya Iida, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Yusuke Nakamura, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.
Metformin has a protective effect through the inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression in hepatocytes.
40th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism (Madrid, Spain, 1-4 September, 2018)

②

1. 菱川秀彦・高分子ミセル化 ICG を用いた胆嚢癌診断・治療の検討・蛍光 Navigation Surgery 研究会・東京・2018 年 4 月

2. 菱川秀彦・高分子ミセル化 ICG を用いた胆嚢癌診断・治療の検討・日本外科学会・大阪・2019 年 4 月

<特許申請・取得状況>

無し

研究成果報告書の概要

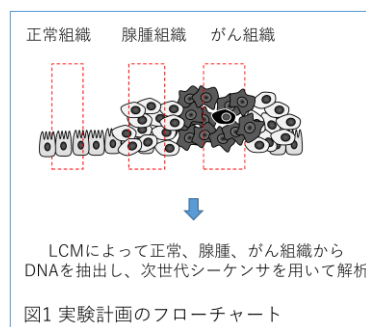
講座等名	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座		事業推進者名	岩井 大
所属部門	がん部門			
分担研究課題	唾液腺良性腫瘍のがん化のメカニズムの解明			
キーワード	唾液腺腫瘍、悪性化、多段階発がん、遺伝子変異、がんゲノム			
講座内の本プロジェクト参加研究者数				4 名
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）				
岩井大（教授）： 研究統括者				
神田晃（講師）： 実務責任者（研究計画の立案）				
Bui Van Dan（大学院4年生）： 動物実験				
鈴木健介（大学院2年生）： ヒトサンプルを用いた検討と動物実験				
研究成果の概要（平成29・30年度の研究成果について）				
唾液腺腫瘍の多くが良性腫瘍であるが、多形腺腫の10%程度が悪性化することが知られており、悪性化のメカニズムの解明と新しい腫瘍マーカーの検索が急務となっている。良性腫瘍から悪性化のメカニズムに関しては、多段階発癌説や癌幹細胞仮説などのメカニズムの存在が推察される。悪性化した多形腺腫の病理組織標本内には、正常細胞、良性腫瘍細胞、がん細胞が混在しているため、腺腫の悪性化メカニズム解明や新しい腫瘍マーカーの発見とその臨床応用につながることを期待される。 そこで、本研究では、図1に示すように悪性化した唾液腺腫瘍のパラフィン切片からレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法（LCM）を用いて、同一の患者の腫瘍内の各組織からDNAを採取し、次世代シーケンサを用いた変異スクリーニングをおこなった（6症例x3=18サンプル）。DNAは、すでにDNAチップ社で解析されており、現在、バイオインフォマティクスと共に結果を解析中である。今後、解析結果をまとめ、論文を作成する予定である。				
一方、動物実験に関しては、APC（adenomatous polyposis coli）遺伝子の変異を持つマウス（APC^{min}/+マウス）では、大腸腺腫から大腸がんを発症することが知られている。さらに、APCと他のがん抑制遺伝子であるPTENとダブルコンディショナルノックアウトマウスでは、唾液腺腫瘍が誘導される。そこで、我々は、多段階発がん説を証明するためのより自然誘導法としてAPC^{min}/+マウスに発がん物質（TPAやDMBA）を唾液腺に注入し作製する考えに至り、検討したところ、図2に示すような新規唾液腺がんモデルの樹立に成功した。今後、LCMを用いてこの唾液腺がん混在する各組織からDNAを採取し、発がん物質がどのがん抑制遺伝子の変異を誘導したかを検討する予定である。 また、ヒト唾液腺良性培養細胞に対しても同様に発がん物質で処理し、新しい<i>in vitro</i>のがん化モデルの作製を試みる。				

正常組織

腺腫組織

がん組織

図2 唾液腺がんモデルマウス
左図： 左腋窩リンパ節転移を認めた唾液腺がん発症マウス
右図： 唾液腺組織H&E染色



病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座	事業推進者名	岩井 大
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 該当なし			
<図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 該当なし			
<学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） 該当なし			
<特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	臨床病理学講座	事業推進者名	蔦 幸治
所 属 部 門	がん部門		
分 担 研 究 課 題	網羅的遺伝子解析技術を用いた各種腫瘍における再発・治療効果予測、原因遺伝子の同定		
キ ー ワ ー ド	遺伝子異常の可視化		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	2 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 蔦幸治：臨床病理学講座 教授 石田光明:臨床病理学講座 講師 柳本泰明：外科学講座 講師 良田大典：外科学講座 助教 齊藤 朋人:胸部外科 講師 谷口 洋平：胸部外科 助教 村川 知弘：胸部外科 教授			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 平成 29 年度に得られた、胆管癌外科手術検体からの網羅的遺伝子解析により得られた遺伝子情報を(株)富士通 FIP と人工知能解析を用いることで約 70-80%近い術後再発予測精度が得られることを証明した。この人工知能解析手法を基に、肺癌の免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子を nCounter を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、AI 解析を行ったところ、80%前後で予測可能であることがわかった。これらの課題については、今後前向き研究が必要と考えられ、また、これらの mRNA の腫瘍組織内での発現パターンを可視化することも検討している。 脾腫瘍や自己免疫性脾炎と鑑別の難しい、濾胞性脾炎の手術検体から nCounter を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い自己免疫性脾炎とは異なる機序である Th17 と関連する Podoplanin の発言が有意であることを証明し、その発現分布も特徴的であることを証明した。 胸腺に発生する上皮性腫瘍である胸腺腫、胸腺癌は希な腫瘍で、しばしば鑑別に苦慮することが有り、かつ、胸腺癌は予後不良で標準的治療がない疾患である。胸腺腫と胸腺癌の手術検体から nCounter を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、胸腺腫と胸腺癌で明らかに発現パターンが異なる mRNA PRAME を同定することが出来た。免疫組織学的にも有意に胸腺癌での PRAME 発現が確認でき、胸腺腫と胸腺癌の鑑別マーカーとして有用と考えられた。また、PRAME タンパク質は癌胎児抗原に属しており治療対象となることが考えられた。PRAME タンパク質の鑑別マーカーと治療ターゲットとしての有用性に関しては現在特許出願中で、また、京都大学の AMED 橋渡し事業シーズ A に採用されている。 (株)コニカミノルタ社との共同開発を行っている蛍光ナノ粒子を用いたタンパクならびに mRNA の組織切片上での精密定量化は HER2 をターゲットに開発を行っているが、他社製の RNA in situ hybridization の感度に達していおらず、改良が必要である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	臨床病理学講座	事業推進者名	薦 幸治
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） ・<u>薦 幸治</u> 6年ぶりに改訂された「肺癌取扱い規約(第8版)」 Medical Technology 無 46(8):737-739 2018 ・<u>Saito T, Tsuta K, Ishida M, Ryota H, Takeyasu Y, Fukumoto KJ, Matsui H, Taniguchi Y, Yanagimoto H, Kurata T, Murakawa T.</u> Comparative study of programmed cell death ligand-1 immunohistochemistry assays using 22C3 and 28-8 antibodies for non-small cell lung cancer: Analysis of 420 surgical specimens from Japanese patients. Lung Cancer あり 125:230-237 2018 ・<u>Yamaki S, Yanagimoto H, Tsuta K, Ryota H, Kon M.</u> PD-L1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma is a poor prognostic factor in patients with high CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes: highly sensitive detection using phosphor-integrated dot staining. International journal of clinical oncology 有 22(4):726-733 2017 <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 該当なし <学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） ・<u>石田光明、良田大典、大江知里、宮坂知佳、柳本泰明、里井壮平、薦 幸治</u> Follicular pancreatitis 3例の臨床病理学的特徴及び網羅的遺伝子解析. 第107回日本病理学会総会. 札幌 2018/06/22 ・<u>齊藤朋人、薦 幸治、石田光明、松井浩史、谷口洋平、村川知弘</u> 浸潤性粘液性腺癌の腫瘍径の検討 第107回日本病理学会 札幌 2018/06/21 ・<u>小塚雅也、里井壮平、良田大典、石田光明、柳本泰明、山本智久、山木 壮、小坂 久、松井陽一.</u> Follicular pancreatitis の臨床病理学および免疫学的特徴に関する検討. 第35回日本胆膵病態・生理研究会 名古屋 2018/06/16 ・<u>良田大典、石田光明、柳本泰明、山本智久、小坂 久、廣岡 智、山木 壮、小塚雅也、松井陽一、里井壮平</u> Follicular Pancreatitis の病理学的背景と網羅的遺伝子解析 第49回日本膵臓学会 和歌山 2018/06 ・Tomohito Saito, Koji Tsuta, Mitsuaki Ishida, Hiroshi Matsui, Yohei Taniguchi, Haruaki Hino, Tomohiro Murakawa Prognostic impact of invasive size, actual tumor size, and mucinous tumor size in invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. 19th World Conference on Lung Cancer Toronto, Canada 2018/09/25 ・Ryota H, Ishida M, Satoi S, Yanagimoto H, Yamamoto T, Kosaka H, Hirooka S, Yamaki S, Kotsuka M, Matsui Y, Okazaki K, Tsuta K Clinicopathological Features and Immune Profiles of Follicular Pancreatitis 50th EPC The jubilee meeting of the European Pancreatic Club ベルリン 2018/06 ・Ryota H, Yanagimoto H, Satoi S, Yamamoto T, Kosaka H, Hirooka S, Yamaki S, Kotsuka M, Matsui Y, Tsuta K Massive Digital Gene Expression Analysis Reveals Predictive Profiles for Recurrence of Biliary Tract Cancer International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists 東京 2018/04 ・Tomohito Saito, Koji Tsuta, Mitsuaki Ishida, Hironori Ryota, Yuki Takeyasu, Kento J. Fukumoto, Hiroshi Matsui, Yohei Taniguchi, Hiroaki Yanagimoto, Takayasu Kurata, Tomohiro Murakawa Comparison study of PD-L1 immunohistochemistry assays with 22C3 and 28-8 for non-small cell lung cancers in Japanese patients: How can the results be translated between the two? 第3回 Immuno-Oncology Forum 東京 2017/09 ・<u>齊藤 朋人、薦 幸治、竹安 優貴、良田 大典、福元 健人、松井 浩史、谷口 洋平、柳本 泰明、横井 崇、倉田 宝保、村川 知弘</u> Comparison Study of PD-L1 Immunohistochemistry Assays with 22C3 and 28-8 for Non-small Cell Lung Cancers 第15回日本臨床腫瘍学会 神戸 2017/07			

＜特許申請・取得状況＞

特許第 6493681 号 特願 2015-532872

発明の名称：肺がんで見出された新規融合遺伝子

PRAME タンパク質は出願中

3. 代謝部門

薬理学講座	70
iPS・幹細胞再生医学講座	73
法医学講座	77
生体情報部門	80
侵襲反応制御部門	83
内科学第二講座	85
外科学講座	87
形成外科学講座	92
皮膚科学講座	98
腎泌尿器外科学講座	100
物理学教室	102

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	薬理学講座	事業推進者名	中邨 智之
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	細胞外マトリックス線維形成の加齢変化に関する研究		
キ ー ワ ー ド	弾性繊維、ミクロフィブリル、LTBP		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	4 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
中邨智之（教授）プロジェクトの統括 赤間智也（准教授）大学院生の指導、遺伝子変異マウスの作成 石戸隆裕（大学院生）誘導型 Fibulin-5 ノックアウトマウスの作成と解析 村部知里（技師）実験補助			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
肺や大動脈といった伸び縮みする組織の弾性は弾性線維と呼ばれる特殊な細胞外マトリックスの線維によって構築されている。本研究では生体内において弾性線維構築に重要な役割を担う細胞外マトリックスタンパク質 Fibulin-5 および LTBP-4 の機能を明らかにするべく、その遺伝子改変マウスを作成して表現型の解析を行っている。 これまでに遺伝子改変マウスを作製しその表現型を調べることで弾性線維形成に必須なタンパク質を特定してきたが、その詳細な役割を解析したり、弾性線維形成に充分であるタンパク質群を特定するには in vitro での実験系が必要である。本研究室では完全な in vitro の系ではないものの、培養細胞を用いた実験系を使って細胞における遺伝子発現の抑制（遺伝子改変マウス由来 MEF あるいは siRNA）および組み換え体精製タンパク質の添加を行うことで、細胞表面での弾性線維形成に必要なタンパク質の同定とその弾性線維形成における機能を明らかにしてきた。細胞表面に形成された弾性線維はその太さや線維形成の形態を観察することで評価してきたが、その力学的な評価はこれまで行われていなかった。そこで新たに、弾性線維を形成させた培養細胞シートの弾性を直接測定することで弾性線維の力学的特徴を調べることを目的とし、その測定システムの構築を行った。 影島賢巳大阪電気通信大教授との共同研究で、培養皿の中の緩衝液中に固定した細胞シートの上に小さな鉄球を置き、細胞シートの下から電磁石で引きつけたときの鉄球の移動距離を調べることで細胞シートの弾性を測定する装置を開発した。この時、培養皿から細胞シートを回収して装置に固定する器具を、本学内に設置された 3D プリンタを使って改良することで、測定の効率を飛躍的に上昇させることに成功した。このシステムを用いて、野生型マウス由来の MEF から通常の培養方法で作製した弾性線維を有する細胞シートと、培地に弾性線維形成阻害剤を添加することで弾性線維のない細胞シートを作製しそれぞれの力学的特性を比較したところ、弾性線維形成を抑制した細胞シートでは弾性が非常に弱くなっていて、高磁力で鉄球を引きつけた時のシートの伸びが弾性線維を持つ細胞シートに比較して大きくなることがわかった。また弾性線維形成に必須なタンパク質である Fibulin-5 や LTBP-4 の遺伝子欠損マウスから MEF を調製し、この細胞シートの力学的特性を調べたところ、野生型 MEF から作製した細胞シートに比べて非常に硬く、シートの伸びが悪くなっていることが明らかとなった。これらのデータは現在集計中であり、近日中に論文化を行う予定である。 本研究はこれまでに例のない、培養細胞上の弾性線維の力学的特徴を直接計測した初めての研究であり、弾性線維の形成およびその成熟化の研究において新たな次元の評価方法の開発に成功したといえる。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	薬理学講座	事業推進者名	中邨 智之
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) - Mori H, Yamada H, Toyama K, Takahashi K, <u>Akama T</u>, Inoue T, <u>Nakamura T</u>: Developmental and age-related changes to the elastic lamina of Bruch's membrane in mice. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 257(2):289-301, 2019. doi: 10.1007/s00417-018-4184-5. レフェリー有 - Narentuya, Takeda-Uchimura, Y., Foyez, T., Zhang, Z., <u>Akama, T.O.</u>, Yagi, H., Kato, K., Komatsu, Y., Kadomatsu, K., Uchimura, K., GlcNAc6ST3 is a keratan sulfate sulfotransferase for the protein-tyrosine phosphatase PTPRZ in the adult brain. Sci. Rep. 9, 4387, 2019. doi:10.1038/s41598-019-40901-2 レフェリー有 - Yamashiro Y, Thang BQ, Shin SJ, Lino CA, <u>Nakamura T</u>, Kim J, Sugiyama K, Tokunaga C, Sakamoto H, Osaka M, Davis EC, Wagenseil JE, Hiramatsu Y, Yanagisawa H: Role of Thrombospondin-1 in Mechanotransduction and Development of Thoracic Aortic Aneurysm in Mouse and Humans. Circ Res 31;123(6):660-672, 2018. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313105. レフェリー有 <u>Nakamura T</u>: Roles of short fibulins, a family of matricellular proteins, in lung matrix assembly and disease. Matrix Biol 73C:21-33, 2018. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.003. レフェリー有 - Littlechild, S.L., Young, R.D., Caterson, B., Yoshida, H., Yamazaki, M., Sakimura, K., Quantock, A.J., <u>Akama, T.O.</u>, Keratan sulfate phenotype in the β-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-7-null mouse cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 59, 1641-1651, 2018. doi:10.1167/iops.17-22716 レフェリー有 - Bultmann-Mellin I, Dinger K, Debuschewitz C, Loewe KMA, Melcher Y, Plum MTW, Appel S, Rappl G, Willenborg S, Schauss AC, Jüngst C, Krüger M, Dressler S, <u>Nakamura T</u>, Wempe F, Alejandro Alcázar MA, Sterner-Kock A: Role of LTBP-4 in alveolarization, angiogenesis and fibrosis in lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 313(4):L687-L698, 2017. doi: 10.1152/ajplung.00031.2017. レフェリー有 - Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, Nishino T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Hanada R, <u>Nakamura T</u>, Inada T, Hasegawa K, Conway SJ, Kita T, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. Circ Res 120(5):835-847, 2017. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309528. レフェリー有 - Fujikawa Y, Yoshida H, Inoue T, Ohbayashi T, Noda K, von Melchner H, Iwasaka T, Shiojima I, <u>Akama TO</u>, <u>Nakamura T</u>: Latent TGF-β binding protein 2 and 4 have essential overlapping functions in microfibril development. Sci Rep 7:43714, 2017. doi: 10.1038/srep43714. レフェリー有 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 該当なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) (国際学会) - Nakamura T, Kitagawa K, Noda K, Yamauchi M, Ogra Y, Taniguchi H, Mecham P.R.: Fibulin-4, a matricellular protein, is essential for the activity of lysyl oxidase, a key enzyme for cross-linking collagens and elastin. Poster presentation at the 8th TAKAO international symposium (Oct 6 – 8, 2017, Matsue, Shimane, Japan). - Nakamura, T.: Essential function of Fibulin-4 in lysyl oxidase activation. Invited talk at Gordon Research Conference on Elastin and Elastic Fiber (July 30 – Aug 3, 2017, Biddeford, U.S.A.). - Nakamura, T.: Latent TGFβ binding protein-2 is essential for the stable structure of ciliary zonule microfibrils. Invited talk at Wakayama Medical University International Symposium: Cataract surgery in exfoliation syndrome (Apr 4, 2017, Wakayama, Japan). <u>Akama, T.O.</u>, Kawasaki, T., <u>Nakamura, T.</u>: Determination of the minimum enzymatic domain of keratanase II. Poster presentation at 2017 annual meeting of Society for Glycobiology (Nov. 5-8, 2017, Portland, OR, USA)			

(国内学会)

1. 中邨智之：Roles of Fibulin-4 and 5 in arterial stiffness and aneurysm. 第 83 回日本循環器学会学術集会 会長特別企画 Special Session 9 遺伝性大動脈瘤・解離の分子医学 招待講演 (パシフィコ横浜、横浜、2019 年 3 月 29-31 日)
2. 中邨智之：「弾性線維再生能はなぜ失われるのか？ 加齢皮膚と日光弾性線維症における弾性線維形成因子の発現」エラスチン・関連分子研究会第 3 回学術集会 (東京ベイ有明ワシントンホテル、東京、2018 年 12 月 1 日)
3. 中邨智之：「生体の伸縮性を生み出すしくみ ～弾性線維形成の分子機構～」日本化粧品学会 第 43 回教育セミナー 招待講演 (ヤクルトホール、東京、2018 年 11 月 2 日)
4. 中邨智之：「弾性線維形成の分子機構」第 50 回日本結合組織学会学術大会 シンポジウム「基礎と臨床の融合」 招待講演 (福岡大学、2018 年 6 月 29 日)
5. 中邨智之：「弾性線維形成の分子機構 ～弾性線維形成分子と多臓器疾患～」エラスチン・関連分子研究会 第 2 回学術集会 特別講演 (新宿ワシントンホテル、2017 年 12 月 2 日)
6. 赤間智也、川寄敏祐、中邨智之：Keratanase II の最小酵素活性ドメインの同定 第 36 回日本糖質学会年会 (旭川市民文化会館 2017 年 7 月 19-21 日)
7. 中邨智之：「生体組織の伸縮性を生み出すしくみ ～弾性線維形成の分子機構とその破綻による多臓器疾患～」第 13 回加齢皮膚医学研究会 特別講演 (コラッセ福島、2017 年 4 月 29 日)

<特許申請・取得状況>

該当なし

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	iPS・幹細胞再生医学講座	事業推進者名	人見 浩史
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	iPS・幹細胞を用いた分化誘導法と分子イメージングを用いた評価法の開発 ：細胞移植・再生医療への応用		
キ ー ワ ー ド	iPS 細胞、分化誘導法、評価法開発、再生医療		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	8 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 人見浩史（教授）：研究全般の指導及び統括 服部文幸（研究教授）、藤岡龍哉（准教授）、白水泰昌（講師）、 中塚隆介・松岡 由和（助教）、角出 啓輔（特別研究員）：実験計画の立案及び実施 藺田 精昭（客員教授）：研究の指導			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） iPS・幹細胞再生医学講座は、平成 30 年 4 月に開設された講座であり、主としてヒト iPS 細胞を用いて、 内分泌領域再生医療を目指した基礎及び臨床研究、心臓再生医療の高度化を目指した基礎研究、造血細胞の再生医療研究に取り組んでいる。さらに旧衛生学講座で行われた、造血幹細胞や白血病幹細胞の特性解明に関する研究も行っている。開設以降の平成 30 年度研究成果について概説する。			
1) iPS 細胞による内分泌細胞再生医療の実現			
腎性貧血に対する新規治療法開発			
再生医療における内分泌細胞の臨床応用を目的として、腎性貧血の新規治療法開発を行っている。遺伝子組み換えエリスロポエチン製剤は、腎性貧血治療に必須となっており、非常に優れた薬剤ではあるが、コストの増加、間歇投与による赤血球数の変動、抗体産生等の問題も有している。当講座ではヒト iPS 細胞を用いて、エリスロポエチン産生細胞を分化誘導することに成功している。そこで腎性貧血治療を目的として、我々が開発したヒト iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞を生体に導入することによりエリスロポエチンの生理的な補充する研究を開始した。さらにエリスロポエチン産生機構を解明することにより、新規腎性貧血治療を開発することも行っている。iPS 細胞の技術は、再生医療を実現するために重要な役割を果たすと期待され、国内外の多くの科学者が臨床応用に向け研究を行っている。これまでにいくつかの臓器に対して、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の試みがなされているが、エリスロポエチン産生細胞に関しては、知りうる限り我々以外の報告は存在せず、本研究は全く新規で独自のものである。患者自身の体細胞から樹立され、ほぼ無限に増殖する能力を有する多能性幹細胞である iPS 細胞を用いることで、免疫抑制の必要ないエリスロポエチン産生細胞を大量に作製することも可能であり、今後も需要の増す腎性貧血治療に対して有効な手段になりうる。本研究で得られる成果は、腎性貧血の治療に対する安価でより生理的な管理を可能とする医療技術の向上に加え、貧血に対する新規治療法の開発による本邦の医薬産業界の活性化をもたらすものであると考えている。平成 30 年度は、関西医科大学 iPS・幹細胞再生医学講座におけるエリスロポエチン産生細胞培養システムの構築と、分子イメージングを用いた評価法開発を開始した。また人工知能（AI）技術を用いたイメージング評価法に関しても、研究を開始した。			

内分泌細胞分化誘導法の開発と臨床応用に向けた取り組み

腎性貧血治療を目的としたエリスロポエチン産生細胞以外に、ヒト iPS 細胞から様々な内分泌細胞を分化誘導する方法の開発を行っている。ヒト iPS 細胞由来内分泌細胞を再生医療に臨床応用する利点としては、以下の3点にあると考えている。一点目は少ない細胞数で機能することができ、臨床応用の際にコスト軽減が期待できる。二点目としては内分泌ホルモンの評価系は確立しており、分化誘導開発に利用することができる。三点目は生体に移植する際に、本来の位置に移植する必要はなく、アクセスのしやすい部位を選択することができる。これらのことから、iPS 細胞を用いた内分泌細胞の分化誘導法開発に注力して研究を行っている。さらに分化誘導した細胞を臨床応用するために、移植デバイスの開発や実験動物モデルの作製を行っている。これらの開発においても、本プロジェクトで構築されたシステムを利用している。

2) iPS 細胞による心臓再生医療の高度化

ヒト iPS 細胞を用いた心臓再生医療の基盤技術開発を行い、臨床応用で必要とされる技術革新を目標として研究を行っている。開始した研究プロジェクトおよび予定しているプロジェクトを列記する。これらの研究は本プロジェクトで構築されたシステムを流用している。

1. iPS 細胞由来心筋細胞を用いた重度心不全治療方法の開発
2. 心房細動の再生医療技術を用いた治療方法の開発
3. iPS 細胞を用いた再生医療全般に応用できる安全性向上方法の開発
4. 心臓の創傷治癒反応の網羅的解析と再生医療への応用
5. iPS 細胞を用いたナノメディスンの開発（理研との共同研究）
6. iPS 細胞の多種組織分化、創薬・健康促進分野への Translation

3) iPS 細胞による造血系・免疫系の再構築および造血幹細胞の純化と特性解明

ヒト iPS 細胞を用いた造血幹細胞研究

ヒト iPS 細胞由来造血幹細胞の分化誘導法開発を行っている。さらに制御性 T 細胞の再生を目指し、研究を開始している。これらの研究成果を用いた病態モデル作成や、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態の再現により、ヒト免疫系及び白血病の病態・治療に対する理解を深化させる。

ヒト未分化造血幹細胞の純化とその幹細胞特性の解明

当講座で開発した骨髓内直接移植法を応用することにより、ヒト未分化造血幹細胞を純化する研究を行っている。さらに特異的分子マーカーの同定を行っている。これらの技術を用い、さらにヒト iPS 細胞技術を融合させることにより、ヒト骨髓ニッチを *in vitro* で再現することで、ヒト造血幹細胞支持因子の同定を目指している。これらの研究に関しても、旧衛生学講座で構築された本プロジェクトのシステムを流用しており、平成 29 年度までに行われた本プロジェクトの研究を継続・発展させた。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	iPS・幹細胞再生医学講座	事業推進者名	人見 浩史
<雑誌論文> 1. Yamashita H, Fukuda K, <u>Hattori F</u>. Hepatocyte-like cells derived from human pluripotent stem cells can be enriched by combination of mitochondrial content and activated leukocyte cell adhesion molecule. JMA Journal. レフェリー有, 2019 in press. 2. Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Yoshihara K, Inoue T, Kato R, Nakata J, <u>Fujioka T</u>, Soma T, Okada M, Ogawa H. Low incidence of HHV-6 reactivation in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with corticosteroid as graft-vs-host disease prophylaxis compared with cord blood transplantation. Transplant Infectious Disease. レフェリー有, e13073, 2019 3. <u>Matsuoka Y</u>, <u>Sumide K</u>, <u>Sonoda Y</u>. One-year Observation of the SCID-repopulating Cell Activities of Human Cord Blood-derived CD34-positive and -negative Hematopoietic Stem Cells. Stem Cell Reviews and Reports. レフェリー有, 2019 in press. 4. 松岡 由和, 藺田 精昭. ヒト臍帯血由来造血幹細胞の陽性分子マーカーとしての GPI-80 抗原の有有用性。Cytometry Research. レフェリー有, 228:13-17, 2018. 5. <u>Matsuoka Y</u>, Nakamura F, Hatanaka K, <u>Fujioka T</u>, Otani S, Kimura T, Fujimura Y, Asano H, <u>Sonoda Y</u>. The number of CD34⁺CD133⁺ hematopoietic stem cell residing in umbilical cord blood units is not correlated with the number of total nucleated cells and CD34⁺ cells: A possible new indicator for quality evaluation of UCB units. International Journal of Hematology. レフェリー有, 108:571-9, 2018 6. <u>Sumide K</u>, <u>Matsuoka Y</u>, Kawamura H, <u>Nakatsuka R</u>, <u>Fujioka T</u>, Asano H, Takihara Y, <u>Sonoda Y</u>. A Revised Road Map for the Commitment of Human Cord Blood CD34-negative Hematopoietic Stem Cells. Nature Communications レフェリー有, 9:2202, 2018. 7. Kawamura H, <u>Nakatsuka R</u>, <u>Matsuoka Y</u>, <u>Sumide K</u>, <u>Fujioka T</u>, Asano H, <u>Sonoda Y</u>. TGF-β Signaling Accelerates Senescence of Human Bone-Derived CD271 and SSEA-4 Double-Positive Mesenchymal Stromal Cells. Stem Cell Reports レフェリー有, 10:920-32, 2018. 8. Zhang Y, Nakano D, Guan Y, <u>Hitomi H</u>, Uemura A, Masaki T, Kobara H, Sugaya T, Nishiyama A. A sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor attenuates renal capillary injury and fibrosis by a vascular endothelial growth factor-dependent pathway after renal injury in mice. Kidney International レフェリー有, 94:524-35, 2018. 9. Wan N, Rahman A, <u>Hitomi H</u>, Nishiyama A. The Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors on Sympathetic Nervous Activity. Frontiers in Endocrinology レフェリー有, 26:9:421, 2018. 10. Li L, Konishi Y, Morikawa T, Zhang Y, Kitabayashi C, Kobara H, Masaki T, Nakano D, <u>Hitomi H</u>, Kobori H, Nishiyama A. Effects of an SGLT2 inhibitor on the systemic and intrarenal renin-angiotensin system in subtotaly nephrectomized rats. Journal of Pharmacological Sciences レフェリー有, 137:220-3, 2018. 11. Rahman A, Yamazaki D, Sufiun A, Kitada K, <u>Hitomi H</u>, Nakano D, Nishiyama A. A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anemia in rodents. PLoS One レフェリー有, 13:e0192531, 2018. 12. Yamazaki D, <u>Hitomi H</u>, Nishiyama A. Hypertension with diabetes mellitus “Complications”. Hypertension Research レフェリー有, 41:147-56, 2018. 13. Li L, Konishi Y, Morikawa T, Zhang Y, Kitabayashi C, Kobara H, Masaki T, Nakano D, <u>Hitomi H</u>, Kobori H, Nishiyama A. Effects of an SGLT2 inhibitor on the systemic and intrarenal renin-angiotensin system in subtotaly nephrectomized rats. Journal of Pharmacological Sciences レフェリー有, 137: 220-3, 2018. 14. Park SH, Uzawa T, <u>Hattori F</u>, Ogino S, Morimoto N, Tsuneda S, Ito Y. "All-in-one" in vitro selection of collagen-binding vascular endothelial growth factor. Biomaterials レフェリー有, 6:270-278, 2018. 15. <u>Matsuoka Y</u>, Takahashi M, <u>Sumide K</u>, Kawamura H, <u>Nakatsuka R</u>, <u>Fujioka T</u>, <u>Sonoda Y</u>. CD34 Antigen and the MPL Receptor Expression Defines A Novel Class of Human Cord Blood-Derived Primitive Hematopoietic Stem Cells. Cell Transplant レフェリー有, 26:1043-1058, 2017. 16. <u>Sonoda Y</u>. Human Hematopoietic Stem Cells: The Current Understanding and Future Prospects. Journal of Hematopoietic Cell Transplantation レフェリー有, 6:70-83, 2017. 17. <u>Hitomi H</u>, Kasahara T, Katagiri N, Hoshina A, Mae S, Kotaka M, Toyohara T, Rahman A, Nakano D, Niwa A, Saito M, Nakahata T, Nishiyama A, Osafune K. Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells ameliorate renal anemia in mice. Science Translational Medicine レフェリー有, 10:1-11, 2018.			

一有, 9:409, 2017.

18. Ansary TM, Fujisawa Y, Rahman A, Nakano D, Hitomi H, Kobara H, Masaki T, Titze JM, Kitada K, Nishiyama A. Responses of renal hemodynamics and tubular functions to acute sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor administration in non-diabetic anesthetized rats. *Scientific Reports* レフェリー有, 7:9555, 2017.
19. Rahman A, Fujisawa Y, Nakano D, Hitomi H, Nishiyama A. Effect of a selective SGLT2 inhibitor, luseogliflozin, on circadian rhythm of sympathetic nervous function and locomotor activities in metabolic syndrome rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* レフェリー有, 44:522-5, 2017.
20. Hasan AU, Kittikulsuth W, Yamaguchi F, Ansary TM, Rahman A, Shibayama Y, Nakano D, Hitomi H, Tokuda M, Nishiyama A. IBMX protects human proximal tubular epithelial cells from hypoxic stress through suppressing hypoxia-inducible factor-1 α expression. *Experimental Cell Research* レフェリー有, 358:343-51, 2017.
21. Guan Y, Nakano D, Zhang Y, Li L, Liu W, Nishida M, Kuwabara T, Morishita A, Hitomi H, Mori K, Mukoyama M, Masaki T, Hirano K, Nishiyama A. A protease-activated receptor-1 antagonist protects against podocyte injury in a mouse model of nephropathy. *Journal of Pharmacological Sciences* レフェリー有, 135:81-8, 2017.
22. Miyashita T, Inamoto R, Fukuda S, Hoshikawa H, Hitomi H, Kiyomoto H, Nishiyama A, Mori N. Hormonal changes following a low-salt diet in patients with Ménière's disease. *Auris Nasus Larynx* レフェリー有, 44:52-7, 2017.
23. Rahman A, Hitomi H, Nishiyama A. Cardioprotective effects of SGLT2 inhibitors are possibly associated with normalization of the circadian rhythm of blood pressure. *Hypertension Research* レフェリー有, 40:535-40, 2017.
24. Hitomi H, Nishiyama A. How should we treat patients with primary aldosteronism to prevent new-onset diabetes mellitus? *Journal of Hypertensions*. レフェリー有, 35:1575-6, 2017.

<学会発表>

1. 松岡由和, 角出啓輔, 中塚隆介, 白水泰昌, 藤岡龍哉, 藺田精昭, 服部文幸, 人見浩史. CRISPR/Cas9 システムを用いたヒト造血幹細胞における CD34 抗原の発現意義の解析. 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸市, 2019 年 3 月 21 日
2. 人見浩史. iPS 細胞由来細胞を用いた腎臓・内分泌領域創薬の新展開, 第 92 回日本薬理学会年会, 大阪市, 2019 年 3 月 14 日
3. 松岡由和, 中塚隆介, 藤岡龍哉. 機械学習による血球細胞の自動判別システム. 第 80 回日本血液学会, 大阪市, 2018 年 10 月 13 日
4. 藺田精昭. ヒト造血幹細胞の最新知見-ヒト造血幹細胞の純化と階層制の解明-第 80 回日本血液学会, 大阪市, 2018 年 10 月 12 日
5. 人見浩史. iPS 細胞を用いた慢性腎不全の次世代治療法, 第 48 回日本腎臓学会西部学術大会, 徳島市, 2018 年 9 月 28 日
6. 松岡由和. Automatic discrimination system for hematopoietic tumor-derived cell lines using Machine Learning. 第 77 回日本癌学会, 大阪市, 2018 年 9 月 27 日
7. 人見浩史, 西山成, 長船健二. iPS 細胞を用いて腎性貧血を治療する, 第 63 回日本透析医学会学術集会, 神戸市, 2018 年 6 月 30 日
8. 人見浩史, 笠原朋子, 片桐直子, 保科あずさ, 前伸一, 小高真希, 豊原敬文, Asadur Rahman, 中野大介, 丹羽明, 斎藤潤, 中畑龍俊, 西山成, 長船健二. iPS 細胞由来エリスロポエチン産生細胞を用いた腎性貧血に対する細胞療法開発, 第 61 回日本腎臓学会学術総会, 新潟市, 2018 年 6 月 10 日
9. 松岡由和, 角出啓輔, 中塚隆介, 藤岡龍哉, 藺田精昭. 重症免疫不全マウスにおける継代移植を用いないヒト造血幹細胞活性の長期解析. 第 28 回日本サイトメトリー学会, 東京都, 2018 年 5 月 26 日
10. Hirofumi Hitomi, Daisuke Nakano, Kenji Osafune, Akira Nishiyama. Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells improve renal anemia in mice, WCP2018, Kyoto, Japan, 2018 年 7 月 4 日
11. Hirofumi Hitomi, Tomoko Kasahara, Naoko Katagiri, Azusa Hoshina, Shin-Ichi Mae, Maki Kotaka, Takafumi Toyohara, Asadur Rahman, Daisuke Nakano, Akira Niwa, Megumu K. Saito, Tatsutoshi Nakahata, Akira Nishiyama, Kenji Osafune. Human pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells improve renal anemia in mice, ISSCR 2018 Annual Meeting, Melbourne, Australia, 2018 年 6 月 21 日

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	法医学講座	事業推進者名	赤根 敦
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	次世代シーケンサーを用いた法遺伝学研究		
キ ー ワ ー ド	次世代シーケンサー，法遺伝学		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 赤根 敦（教授）：研究の統括 橋谷田真樹（准教授）：研究計画の立案，遂行 松本智寛（講師）：データの収集および解析 吉村澄孝（助教）：データの収集および解析 大林将弘（技術員）：データの収集および解析			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 平成 29 年度 （1）mtDNA whole genome analysis 青森県八戸市で発掘された畑内遺跡は，18 世紀初頭から 19 世紀中頃の遺跡とされ，計 45 体分の人骨が見つっている．以前の研究では識別が不可能であった，人骨 3 体と発掘研究者 2 名について mtDNA whole genome analysis を行った．その結果，発掘された 3 体は同じ mtDNA を持ち，同じ母系であることが確認された．さらに研究者 2 名の配列にも違いが見られ，全ての mtDNA 配列を見ることで人骨 3 体，研究者 2 名の識別が可能となった． （2）165 single nucleotide polymorphism (SNP) データによる日本人と他民族との比較 以前作成した，祖先及び家系情報を示す 165SNP 日本人データベースを元に，1000 Genome Project からアフリカ人，ヨーロッパ人，ベトナム人そして中国人の同じ 165SNP データを抽出し，それぞれの遺伝頻度分布の比較を行い，統計的解析を行った．その結果，165SNP データを用い入ることで，アフリカ人，ヨーロッパ人，東アジア人の識別を行うことが可能となった．しかし，東アジア人のベトナム人，中国人，日本人を識別するには，より多くの有効な SNP が必要であることが示唆された． （3）心臓突然死例の次世代シーケンサーによる遺伝子解析 剖検時に採取した血液から多数の遺伝子変異解析を行う molecular autopsy は，明らかな死因が見られない心臓突然死に有効である．これまでにデータに加え，今年度は乳幼児 2 例を含めた 3 例の解析を行った．3 例とも 1600 を超える塩基置換が見つかり，病因と報告されている変異がそれぞれ 2～3 ヶ所見られた．特に乳幼児の一人ではリアノジン受容体 2 遺伝子 (<i>RYR2</i>)に c. 3320C>T (p. Thr1107Met) の重篤な変異が見られた．			

平成 30 年度

(4) DNA メチル化解析による年齢推定

現場に残された生体試料や身元不明のご遺体からの DNA からその由来となる人物の年齢を推定することができれば、それは法医実務上極めて有力な情報となる。当講座にて解剖に付され、死亡時年齢が判明しておりかつ外因死と診断された 40 症例の血液から DNA を抽出し、試料とした。バイサルファイト処理後、次世代シーケンサー Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific) を用いてメチル化解析を行った。ターゲットとした遺伝子は、Clorf1, CCDC10, ELOVL2, FHL2, SLC6A4, TRIM59, KLF14, F5, ASPA, PDE4C の計 10 遺伝子である。得られたシーケンス結果から各 CpG 部位におけるメチル化率を算出し、回帰分析にてメチル化率と実年齢の相関関係を、さらに選択された複数のメチル化部位による重回帰分析によって推定年齢を検討した。その結果、10 遺伝子 16 カ所のメチル化部位の情報で、修正済決定係数は 0.949 (標準偏差 6.04) とより正確な推定が可能となった。

(5) 新たな Ancestry informative SNP markers kit の開発

DNA から由来となる人物の民族的背景を探索することは、法医実務において重要な懸案事項である。そこで海外の複数の大学等で構成される、新たな ancestry informative markers の共同開発プロジェクトに参加した。人種の推定に有効だとされている 214SNPs を採用し、S5 System (Thermo Fisher Scientific) を用いてタイピングを行った。その結果、アフリカ、ヨーロッパ、中東、南アジア、東アジア、オセアニア、アメリカ先住民をそれぞれ確実に識別できることが確認された。しかし、残念ながら、東アジアの中のカンボジア人、中国人、韓国人、日本人を識別することはできなかった。そのためにはより多くのマーカーが必要になると思われる。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	法医学講座	事業推進者名	赤根 敦
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 1. M.Hashiyada, N.Adachi, A. Akane, T. Matsumoto, S. Yoshimura・The detailed examination of the human ancient mitochondrial DNA using the Ion PGMTM System・Forensic Sci Int Genet Supplement series・査読有・Vol6・2017・e156-e158. https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2017.09.061 2. 橋谷田真樹, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝, 大内 司, 舟山真人・HID-Ion AmpliSeq™ Ancestry Panel による日本人 SNP データベースの構築・DNA 多型・査読有・vol.25・pp154-156・2017. 3. Tsuji S, Suruda C, Hashiyada M, Kimata T, Yamanouchi S, Kitao T, Kino J, Akane A, Kaneko K・Gut Microbiota Dysbiosis in Children with Relapsing Idiopathic Nephrotic Syndrome・Am J Nephrol・査読有・47(3):164-170・2018. 4. 橋谷田真樹, 大林将弘, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝, 大内 司, 舟山真人. 165SNPs を用いた日本人を含む人種間の集団遺伝学解析 -第2報-. DNA 多型・査読有・Vol.26・174-177・2018. <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） なし <学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） 1. M.Hashiyada, N.Adachi, A. Akane, T. Matsumoto, S. Yoshimura・The detailed examination of the human ancient mitochondrial DNA using the Ion PGMTM System. 27th Congress of the International Society for Forensic Genetics. Seoul・Korea・27 Aug.- 2 Sep. 2017. 2. 橋谷田 真樹, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝磨・突然死例における molecular autopsy の検討とその意義 -第2報-・第101次日本法医学会学術全国集会・東京・平成29年6月8～9日. 3. 橋谷田真樹, 大林将弘, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝・Ancestry informative markers (AIMs) による日本人を含む集団遺伝学的解析・第64回日本法医学会学術近畿地方集会・和歌山・平成29年11月11日. 4. 橋谷田真樹, 大林将弘, 赤根 敦, 松本智寛, 吉村澄孝, 大内 司. 舟山真人・165SNPs を用いた日本人を含む人種間の集団遺伝学解析 -第2報-・日本DNA多型学会第26回学術集会・11月29～12月1日・東京. 5. Masaki Hashiyada, Masahiro Obayashi, Tomohiro Matsumoto, Sumitaka Yoshimura and Atsushi Akane・Age estimation based on DNA methylation analysis using blood samples・IALM・Fukuoka, Jun 5-8, 2018. 6. 橋谷田真樹, Runa Daniel, 赤根 敦, 松本智寛, 大林将弘, 吉村澄孝・新たな Ancestry informative SNP markers kit の開発 v 第65回日本法医学会学術近畿地方集会・神戸・平成30年11月10日. 7. 大林将弘, 橋谷田真樹, 松本智寛, 吉村澄孝, 赤根 敦・次世代シーケンサーによるDNAメチル化解析と死亡時年齢との相関・日本DNA多型学会第26回学術集会・松江・平成30年12月6～7日. <特許申請・取得状況> なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	生体情報部門	事業推進者名	松田 達志
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	Arf-mTORC1 軸を介した免疫制御機構の解明		
キ ー ワ ー ド	小胞輸送制御、Arf ファミリー、mTORC1、細胞増殖		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	4 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
松田達志（准教授）：研究の総括 住吉麻実（助教）：T 細胞における Arf 経路の役割解明 小谷唯（研究員）：B 細胞における Arf 経路の役割解明 Hanh Hong CHU（研究員）：好酸球における Arf 経路の役割解明			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
ADP-ribosylation factor (Arf)は Arf1-6 から成る低分子量 G タンパク質ファミリー分子であり、細胞の恒常性維持に必須な小胞輸送を制御することが知られている。また、ショウジョウバエ由来培養細胞を対象にした siRNA ライブラリースクリーニングにより、mTORC1 経路の活性化に関与する可能性が示唆されている。しかし、従来得られているこれらの知見は、培養細胞を対象とした過剰発現や阻害剤を用いた解析に依拠しており、実際の生体内でどのような生理機能を担っているかについては、驚くほど知見が少ない。例えば、Arf 阻害剤である Brefeldin A は <i>in vitro</i> で T 細胞からのサイトカイン分泌阻害に用いられるが、個体レベルの免疫応答において Arf 経路が果たす役割は不明であった。そこで、Arf 経路の生理的役割を明らかにすべく、Arf の免疫細胞特異的ノックアウトマウスの樹立に取り組んだ。具体的には、mTORC1 経路を介した制御が知られる T 細胞・B 細胞、ならびに予備的な解析から mTORC1 経路が分化過程で必須の役割を果たすことが示唆されている好酸球のそれぞれについて、Arf 経路の欠損が及ぼす影響の検証に取り組んだ。 T 細胞においてどのファミリーメンバーが発現しているかを qPCR によって評価したところ、Arf1 と Arf6 が高いレベルで発現していることが明らかとなった。そこで、T 細胞特異的 Cre 発現マウスである Lck-Cre と Arf1-flox マウス・Arf6-flox マウスをそれぞれ交配することで、T 細胞特異的な Arf1 欠損マウス（以下、Arf1-TKO）・Arf6 欠損マウス（以下、Arf6-TKO）を樹立した。驚くべきことに、Arf1-TKO・Arf6-TKO は、何れも T 細胞分化に目立った変化は認められず、BrefeldinA 処理で認められるようなサイトカインの産生阻害も一切観察されなかった。この表現型は Arf1-TKO と Arf6-TKO を交配して得られる Arf1/6-TKO マウスにおいても同様であった。そこで、以降、Arf1/6-TKO に着目して免疫応答能に変化が認めるか否か、種々の解析に取り組んだ。その結果、Arf1/6-TKO マウスでは、B 細胞による抗体産生のヘルプ機能は正常に認められるにも関わらず、多発性硬化症のモデルとして知られる EAE の発症がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。現在、その分子メカニズムの解明に取り組んでいる。 B 細胞における Arf 経路の役割を明らかにすべく、同様に、B 細胞特異的 Cre 発現マウスで			

ある mb1-Cre マウスと、Arf1-flox・Arf6-flox・Arf1/6-flox との交配を進めたところ、B 細胞特異的な Arf1 欠損マウス（以下、Arf1-BKO）・Arf6 欠損マウス（以下、Arf6-BKO）・Arf1/6 二重欠損マウス（以下、Arf1/6-BKO）において、それぞれ末梢 B 細胞数の低下と骨髄における部分的な分化障害が観察された。一方、個体に対する免疫応答を調べたところ、Arf1-BKO と Arf1/6-BKO においてのみ著しい抗体産生能の低下が認められた。すなわち、B 細胞による抗体産生過程において Arf1 が重要な役割を果たすことが強く示唆された。現在、その分子機構の解明に取り組んでいる。

骨髄細胞から *in vitro* で好酸球を分化誘導する際に、mTORC1 阻害剤である rapamycin を共存させると得られる好酸球数が著しく減少すること（未発表）から、Arf-mTORC1 軸が好酸球分化に関わる可能性を考えた。そこで、タモキシフェン誘導性に Arf1 ならびに Arf6 を欠損可能なマウス（以下、Arf1-CreERT2 ならびに Arf6-CreERT2）マウスを樹立し、*in vitro* 分化系における Arf 欠損の効果検証に取り組んでいる。マウスの樹立が先行している Arf6-CreERT2 由来の骨髄において、タモキシフェン添加群における好酸球数の低下が観察されており、そのメカニズムの解析を進めている。

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	侵襲反応制御部門	事業推進者名	広田 喜一
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	酸化ストレスがミトコンドリアの機能・動態に及ぼす影響の探求		
キ ー ワ ー ド	酸化ストレス、酸素代謝、ミトコンドリア、炎症		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	5 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 教員 広田 喜一（学長特命教授，研究統括） 松尾 禎之（講師，分子・細胞生物学的解析） 大学院生 楠 宗矩（分子・細胞生物学的解析） 正司 智洋（分子・細胞生物学的解析） 右馬 猛生（分子・細胞生物学的解析）			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 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取り組んでいる。 1. 麻酔薬 propofol 毒性と細胞内酸素代謝のクロストーク プロポフォールは細胞毒性をもち細胞死を誘導することが知られているがその分子機序には不明な点が多く詳細な機序についての知見も乏しい。細胞生物学実験によりプロポフォールによる細胞死におけるミトコンドリア電子伝達抑制の役割と転写因子 HIF-1 活性化による細胞死の抑制の知見を得た。すなわちプロポフォールは臨床使用濃度の範囲内で、濃度・時間依存的にかつミトコンドリア依存的に細胞障害をもたらす細胞外環境をアシドーシスに導く。この現象はプロポフォール注入症候群の細胞生物学的な基盤を形成している可能性がある。またこの細胞障害は HIF-1 の人為的な活性化でレスキューできる可能性がある事が示された。 2. 炎症が惹起する代謝リプログラミングの分子機序の探求 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。自然免疫細胞の活性化に伴う代謝変容について、細胞外フラックス解析の手法を用いて検証を行った。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を LPS/IFN-γ の投与により活性化したところ、解糖活性の速やかな上昇が認められた。一方 LPS/IFN-γ 投与後数時間以内に酸素消費量の劇的な低下が誘導され、マクロファージの活性化に伴う代謝リプログラミング現象が観察された。LPS/IFN-γ 刺激による酸化的リン酸化の抑制は新規タンパク質の合成を介した応答であり、HIF-1 の活性化を伴うことも明らかとなった。代謝転換の誘導には短時間 (30 分) の LPS/IFN-γ 処理で十分であり、LPS/IFN-γ 除去後も 24 時間に渡って代謝リプログラミング状態が維持された。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	生体情報部門	事業推進者名	松田 達志
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 1) Takayuki Imanishi, Midori Unno, Wakana Kobayashi, Natsumi Yoneda, <u>Satoshi Matsuda</u>, Kazutaka Ikeda, Takayuki Hoshii, Atsushi Hirao, Kensuke Miyake, Glen N Barber, Makoto Arita, Ken J Ishii, Shizuo Akira, and Takashi Saito. Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. Life Sci Alliance. 査読有 2019 2. pii: e201800282. (doi: 10.26508/lsa.201800282.) 2) Nadya NA, Tezuka H, Ohteki T, <u>Matsuda S.</u>, Azuma M, and Nagai S. PI3K-Akt pathway enhances the differentiation of interleukin-27-induced type 1 regulatory T cells. Immunology. 査読有 2017 152: 507-516 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 該当なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1) <u>小谷唯</u>、<u>住吉麻実</u>、江口稚佳子、金保安則、渡邊利雄、<u>松田達志</u>・B細胞における低分子量Gタンパク質 Arf 経路の機能解明・平成30年度文部科学省新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」成果発表会・大津市・2019年1月30日～1月31日 2) <u>Mami Sumiyoshi</u>, <u>Yui Kotani</u>, Yasunori Kanaho, and <u>Satoshi Matsuda</u>・Arf pathway regulates the pathogenicity of Th17 dependent autoimmune disease・第47回日本免疫学会・福岡市・2018年12月10日～12日 3) <u>小谷唯</u>、<u>住吉麻実</u>、江口稚佳子、金保安則、渡邊利雄、<u>松田達志</u>・B細胞における低分子量Gタンパク質 Arf 経路の機能解明・第41回日本分子生物学会年会・横浜市・2018年11月28日～30日 4) <u>住吉麻実</u>、江口稚佳子、小河穂波、<u>小谷唯</u>、伊藤量基、神田晃、金保安則、渡邊利雄、<u>松田達志</u>・T細胞における低分子量Gタンパク質 Arf ファミリーの機能解析・第40回日本分子生物学会年会・神戸市・2017年12月6日～12月9日 5) <u>小谷唯</u>、<u>住吉麻実</u>、伊藤量基、神田晃、平尾敦、渡邊利雄、<u>松田達志</u>・制御性T細胞の分化誘導に関わるシグナル伝達経路の解明・第40回日本分子生物学会年会・日本・神戸市・2017年12月6日～12月9日 6) <u>松田達志</u>・B細胞分化におけるmTORC1シグナルの役割・第15回がんとハイポキシア研究会(招待講演)・淡路市・2017年11月10日 <特許申請・取得状況> 該当なし			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	侵襲反応制御部門	事業推進者名	広田 喜一
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) ① Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, <u>Kusunoki M</u>, <u>Shoji T</u>, <u>Uba T</u>, Adachi T, Iwai K, Nishi K, Harada H, Bono H, <u>Matsuo Y</u>, <u>Hirota K</u>. Suppression of mitochondrial oxygen metabolism mediated by the transcription factor HIF-1 alleviates propofol-induced cell toxicity. Sci Rep. 2018;8(1):8987. 10.1038/s41598-018-27220-8 査読有 ② Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, Nishi K, <u>Kusunoki M</u>, <u>Shoji T</u>, <u>Uba T</u>, <u>Matsuo Y</u>, Adachi T, Hayashi JI, Takenaga K, <u>Hirota K</u>. Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner. PLoS ONE. 2018;13(2):e0192796. 10.1371/journal.pone.0192796 査読有 ③ Nguyen HT, Noguchi S, Sugie K, <u>Matsuo Y</u>, Nguyen CTH, Koito H, Shiojima I, Nishino I, Tsukaguchi H. Small-Vessel Vasculopathy Due to Aberrant Autophagy in LAMP-2 Deficiency. Sci Rep. (2018) 8; 3326. doi: 10.1038/s41598-018-21602-8. 査読有 ④ Okamoto A, Sumi C, Tanaka H, <u>Kusunoki M</u>, Iwai T, Nishi K, <u>Matsuo Y</u>, Harada H, Takenaga K, Bono H, <u>Hirota K</u>. HIF-1-mediated suppression of mitochondria electron transport chain function confers resistance to lidocaine-induced cell death. Sci Rep. 2017;7(1):3816. 10.1038/s41598-017-03980-7 査読有 ⑤ 広田 喜一. 2. 低酸素の生物学—低酸素誘導性因子 (HIF) の果たす役割. Intensivist. 2018;10(2):259-69. 査読無 ⑥ 広田 喜一. 酸素生物学を読み解く 低酸素誘導性因子研究の今昔物語. Life Support and Anesthesia. 2018;25(8):897-905. 査読無 ⑦ 松尾 禎之, 広田 喜一. 小胞体内レドックスバランスの維持機構. 細胞. 2018;50(4):208-9. 査読無 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 該当なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地(海外の場合は国名と都市名)・発表年月) ① 田畑 凱光、松尾 禎之、広田 喜一 炎症が惹起する代謝リプログラミングの分子機序の探求 第15回 がんとハイポキシア研究会 千葉市 2018/11/09 ② 松尾 禎之、広田 喜一 グルタチオンシステムと連動した小胞体酸化還元酵素の活性制御およびレドックス恒常性維持の分子機構解析 第15回がんとハイポキシア研究会 淡路市 2017/11/10 ③ 田中宏昌、角 千里、松尾 禎之、広田 喜一 HIF-1 活性化はミトコンドリア電子伝達系を抑制してプロポフォールの細胞障害を軽減する 第15回がんとハイポキシア研究会 淡路夢舞台国際会議場 淡路市 2017/11/10 ④ 角 千里、広田 喜一、楠 宗矩、岡本 明久、西 憲一郎、松尾 禎之 サイブリッド細胞を用いたプロポフォール細胞毒性の検討 第15回がんとハイポキシア研究会 淡路夢舞台国際会議場 淡路市 2017/11/10 ⑤ 松尾 禎之、広田 喜一 小胞体内レドックスバランスの維持とストレス感知機構の解析：タンパク質のレドックス状態を指標としたストレスモニタリング 第70回日本酸化ストレス学会学術集会 つくば市 2017/6/28 ⑥ 角 千里、広田 喜一、楠 宗矩、岡本 明久、西 憲一郎、松尾 禎之 サイブリッド細胞を用いたプロポフォール細胞毒性の検討-プロポフォール注入症候群の病態生理学 第64回日本麻酔科学会学術集会 神戸国際展示場 神戸市 2017/6/9 ⑦ 岡本 明久、楠 宗矩、角 千里、西 憲一郎、松尾 禎之、広田 喜一 抗酸化物質の N-アセチルシステインはリドカインが誘導する活性酸素種産生や細胞死を抑制する 第64回日本麻酔科学会学術集会 神戸国際展示場 神戸 2017/6/8 <特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講座等名	内科学第二講座	事業推進者名	塩島 一郎
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	食後高血糖・高中性脂肪血症が骨髄機能に及ぼす影響		
キ ー ワ ー ド	血管内皮前駆細胞（EPC）、骨髄老化、p53		
講座内の本プロジェクト参加研究者数		5 名	
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
1）塩島 一郎：全体の総括 2）岩崎 真佳：臨床研究の遂行、EPC 数測定 3）堀谷 啓太：マウス骨髄機能解析 4）岸本 広志：臨床検体の解析 5）和田 健作：動物モデル作成			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell: EPC）は骨髄から血中に動員されて血管内皮細胞に分化しうる細胞で、血管内皮修復作用や動脈硬化抑制作用を有する。糖脂質代謝異常を含めた冠危険因子は循環血中の血管内皮前駆細胞数を減少させ、血管内皮機能低下や将来の心血管イベント増加につながる事が知られている。また、食後の高血糖や高中性脂肪血症が重要な動脈硬化促進因子であることも以前から報告されている。しかしながら食後高血糖・高中性脂肪が骨髄環境や造血幹細胞におよぼす影響についてはよく知られていない。 そこで本研究ではまず正常耐糖能および糖尿病・耐糖能異常の患者に対して糖・脂質を同時に負荷し、血中の血管内皮前駆細胞数と相関する糖脂質パラメーターについて検討した。その結果、糖尿病や耐糖能異常を有する患者群では正常耐糖能のグループと比べて有意に循環血中の血管内皮前駆細胞数が減少しており、また、単変量解析・多変量解析によって、食後 60 分後の血糖値が循環血中の血管内皮前駆細胞数と最も良好な相関を示すこと、および、食後高中性脂肪血症を有する患者群では、食後 60 分後の血糖値と循環血中の血管内皮前駆細胞数との相関がより良好なものになることを見いだした。 以上の臨床研究の結果から、食後高血糖と食後高中性脂肪血症が同時に存在すると相乗的に骨髄環境に影響を与え血管内皮前駆細胞数を減少させることが予想された。そこでマウスを用いて食後高血糖・高中性脂肪血症のモデルを作成し、食後高血糖および食後高中性脂肪血症が、血管内皮前駆細胞のニッチである骨髄環境へ及ぼす影響を検討した。夜間絶食後翌朝に糖液・中性脂肪液を静脈内投与することを 1 週間継続して、食後高血糖・高中性脂肪血症のマウスモデルを作成した。このマウスの骨髄を解析したところ、造血幹細胞数の増加、造血幹細胞分化能の低下、顆粒球系細胞数の増加、リンパ球系細胞数の減少が認められた。これらの特徴は老化した骨髄でみられる所見と一致しており、さらに食後高血糖・高中性脂肪血症モデルマウスの骨髄において老化マーカーである p53 の発現増加、抗老化遺伝子 Sirt1 の発現低下がみられることから、食後高血糖と食後高中性脂肪血症が同時に存在することにより骨髄老化がおこり、それが血管内皮前駆細胞数減少の原因である可能性が示唆された。今後は食後高血糖・高中性脂肪血症が骨髄老化をおこす機序について明らかにしていきたい。 血管内皮前駆細胞は障害を受けた血管内皮の修復に重要な役割を果たしており、その機能障害は心血管疾患の発症に関与することが知られている。また、糖尿病患者における高中性脂肪血症はスタチンでは治療できない residual risk のひとつとして知られているが、現時点ではスタチンと同等のリスク軽減効果を持つ薬剤は知られていない。食後高血糖・食後高中性脂肪血症が血管内皮前駆細胞およびそのニッチである骨髄の機能に及ぼす影響とそのメカニズムが明らかになれば、糖尿病における大血管障害抑制のための新たな治療法開発につながる事が期待される。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	内科学第二講座	事業推進者名	塩島 一郎
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 1. Hata Y, <u>Iwasaki M</u>, Fujitaka K, Park H, Sato D, Enoki C, Minato N, <u>Horitani K</u>, Nakano M, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, Koyanagi M, Adachi Y, Yamamoto Y, Zeiher AM, Dimmeler S, <u>Shiojima I</u>. Heparin Induces the Mobilization of Heart-Derived Multipotent Mesoangioblasts During Cardiac Surgery With Cardiopulmonary Bypass or Cardiac Catheterization. Circ J. 査読有 82 巻 5 号: 1459-1465, 2018 年 <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 該当なし <学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） 1. <u>Horitani K</u>, <u>Iwasaki M</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, Takahashi K, Nishimura K, Ukita C, Toyoda N, <u>Shiojima I</u>. Repetitive postprandial glucose/triglyceride spike activate p53 in bone marrow progenitor cells and induce premature aging of bone marrow. (European Society of Cardiology, Munich/Germany, 2018 年 8 月) 2. <u>Horitani K</u>, <u>Iwasaki M</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. Repetitive Postprandial Combined Metabolic Spikes Induce Premature Aging of Bone Marrow. (JCS-BCVR, 奈良, 2018 年 9 月) 3. <u>Horitani K</u>, <u>Iwasaki M</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. Postprandial glucose/triglyceride spikes reduces circulating EPC number by inducing premature aging of bone marrow. (第 35 回国際心臓研究学会日本部会, 東京, 2018 年 12 月) 4. <u>Horitani K</u>, <u>Iwasaki M</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. Postprandial glucose/triglyceride spikes reduces circulating EPC number by inducing premature aging of bone marrow. (第 83 回日本循環器学会, 横浜, 2019 年 3 月) <特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	外科学講座	事業推進者名	海堀 昌樹
所 属 部 門	①代謝部門、②がん部門		
分担研究課題	①誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）由来の一酸化窒素産生を障害マーカーとした肝臓保護薬剤の解析 ②高分子ミセル化 ICG を用いた癌診断・治療の検討		
キ ー ワ ー ド	①inducible nitric oxide synthase, nuclear factor-κB, rat primary cultured hepatocyte, rat liver injury model②ICG-lactosome、Photodynamic Therapy、Drug Delivery System		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	①17名、②6名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
① 企画 (テーマ、人員構成、財源)(3); 海堀昌樹, 奥村忠芳, 権雅憲 実験と解析(11);三木博和, 中竹利知, 上山庸佑, 菱川秀彦, 松島英之, 中村有佑, 飯田洋也, 坂口達馬, 小塚 雅也, 橋本裕也, 八田雅彦, 考察、論文校正 (6) ;海堀昌樹, 奥村忠芳, 権雅憲, 石崎守彦, 松井康輔, 徳原 克			
② 企画 (テーマ、人員構成、財源)(1); 海堀昌樹 実験と解析(2);菱川秀彦, 津田 匠 考察、論文校正 (4) ;海堀昌樹, 奥村忠芳, 石崎守彦, 松井康輔			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
①レボシメンダン（levosimendan, 急性心不全治療薬）は”カルシウムセンシタイザー”として知られているが、様々な炎症性サイトカインの発現やアポトーシスシグナル経路に影響を与えることより、心臓以外の臓器障害に効果を示すことが推察されている。70%肝切除ラットにリポポリサッカライド(LPS)処理して作成した急性肝不全モデルを用いて、レボシメンダンが生存率を増加させることを報告した。同時に、ラット初代培養肝細胞（in vitro 肝障害）モデルを用いて、TNF-α, cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 や誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の発現抑制を介したメカニズムを明らかにした[12]。後者の iNOS の生成物である一酸化窒素（NO）は肝障害マーカーの一つとして、近年よく知られている。[12] Sakaguchi et al. Levosimendan pretreatment improves survival of septic rats after partial hepatectomy and suppresses iNOS induction in cytokine-stimulated hepatocytes. Scientific Reports, accepted 1-9-2019.			
ランソプラゾール（lansoprazole, proton pump 阻害剤）はラット初代培養肝細胞において、iNOS 誘導/NO 産生や TNF-α 発現を“NF-κB 活性化”の阻害を介して抑制した。さらに、D-galactosamine/LPS 処理して作成したラット急性肝障害モデルにおいて、その生存率を亢進した[14]。ランソプラゾールはその治療効果の可能性をさらに模索しなければならないが、肝障害に軽減作用を示すと推測される。			
[14] Nakatake et al. The proton pump inhibitor lansoprazole has hepatoprotective effects in in vitro and in vivo rat models of acute liver injury. Digestive Diseases and Sciences, accepted 4-6-2019.			
②島津製作所で開発された高分子ミセル化 ICG（ICG ラクトソーム）は、血管透過性・滞留性亢進効果から癌部に集積する Drug Delivery System（DDS）ことが可能であり、近赤外線を用いた光線力学療法（Photodynamic Therapy; PDT）を行うことにより抗腫瘍効果を得られる。			
ICG ラクトソームのヒト肝細胞癌のマウスモデルへの腫瘍集積性を確認し、ヒト肝細胞癌のマウスモデル実験において、抗腫瘍効果を示し、温熱効果による腫瘍細胞のアポトーシスを確認した<1>			
[1]Tsuda T, Kaibori M, Hishikawa H, et al. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma. PLoS One. 2017; 31; 12(8): e0183527. doi:			
またヒト胆嚢癌のマウスモデルに対し、ICG ラクトソームの腫瘍集積性を確認。ICG ラクトソームが PDT 後再集積することを発見し、1 回投与で 2 回照射が可能であることを発見した。			
ヒト胆嚢癌のマウスモデル実験において、コントロール群および 1 回照射、2 回照射の抗腫瘍効果を検討し、2 回照射>1 回照射<コントロールで抗腫瘍効果を確認することができた。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	外科学講座	事業推進者名	海堀 昌樹
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 以下論文は全てレフェリー有り			
①			
1. Miki H, Tokuhara K, Oishi M, Tanaka Y, Nakatake R, Ueyama Y, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T, Kon M. Elental® amino acid component has protective effects on primary cultured hepatocytes and a rat model of acute liver injury. Nutrition Research, in press (5-1-2017). <i>Nutrition Research</i> , 2017; 42: 71-84.			
2. Tsuda T, Kaibori M, Hishikawa H, Nakatake R, Okumura T, Ozeki E, Hara I, Morimoto Y, Yoshii, Kon M. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma. <i>PLoS One</i> . 2017 Aug 31;12(8):e0183527.			
3. Fujii A, Okuyama T, Wakame K, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. Identification of anti-inflammatory constituents in phellodendri cortex and coptidis rhizoma by monitoring the activity to suppression of nitric oxide production. <i>J Nat Med</i> . 2017; 71(4): 745-756.			
4. Nakatake R, Hishikawa H, Matushima H, Nakamura Y, Ishizaki M, Matsui K, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T, Kon M. Curcumin protects liver inflammation by suppressing expression of inducible nitric oxide synthase in primary cultured rat hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2017; 7(9); 716-734.			
5. Okuyama T, Nakatake R, Kaibori M, Okumura T, Kon M, Nishizawa M. A sense oligonucleotide to inducible nitric oxide synthase mRNA increases the survival rate of rats in septic shock. <i>Nitric Oxide</i> , 2018; 72: 32-40.			
6. Nakatake R, Kaibori M, Nakamura Y, Tanaka Y, Matushima H, Okumura T, Murakami T, Ino Y, Todo T, Kon M. A third-generation oncolytic herpes simplex virus inhibits the growth of liver tumors in mice. <i>Cancer Res</i> . 2018; 109; 600-610.			
7. Nakatake R, Iida H, Ishizaki M, Matsui K, Nakamura Y, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T. Metformin inhibits expression of the proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2018; 8(3): 175-192.			
8. Nakamura Y, Iida H, Nakatake R, Sakaguchi T, Kaibori M, Okumura T, Hamada Y, Doi T. L-Carnitine has a liver-protective effect through inhibition of inducible nitric oxide synthase induction in primary cultured rat hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2018; 8(3): 212-227.			
9. Nakatake R, Kotsuka M, Hashimoto Y, Hatta M, Ishizaki M, Matsui K, Kaibori K, Nishizawa N, Okumura T. Glutathione inhibits expression of the proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2018; 8(10): 495-509.			
10. Yamauchi Y, Okuyama T, Ishii T, T, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. Sakuranetin downregulates inducible nitric oxide synthase expression by affecting interleukin-1 receptor and CCAAT/enhancer-binding protein β . <i>J Nat Med</i> . 2019; 73(2): 353-368.			
11. Dwijayanti DR, Okuyama T, Okumura T, Ikeya Y, Nishizawa M. The anti-inflammatory effects of Indonesian and Japanese bitter melon (<i>Momordica charantia</i> L.) fruit extracts on interleukin-1 β -treated hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2019; 9(1): 16-33.			
12. Sakaguchi T, Hashimoto Y, Matsushima H, Hishikawa H, Nishizawa N, Okumura T, Kaibori M. Levosimendan pretreatment improves survival of septic rats after partial hepatectomy and suppresses iNOS induction in cytokine-stimulated hepatocytes. <i>Scientific Reports</i> ; accepted 1-9-2019.			
13. Nishizawa M, Okumura T, Ikeya Y. Assessment of anti-inflammatory effects of Japanese Kampo medicine versus functional foods. <i>Functional Foods in Health and Disease</i> , 2019; 9(2): 79-91.			
14. Nakatake R, Hishikawa H, Kotsuka M, Ishizaki M, Matsui K, Nishizawa M, Yoshizawa K, Kaibori M, Okumura T. The proton pump inhibitor lansoprazole has hepatoprotective effects in in vitro and in vivo rat models of acute liver injury. <i>Digestive Diseases and Sciences</i> , accepted 4-6-2019.			
15. Ueyama Y, Tokuhara T, Miki H, Nakatake R, Sakaguchi T, Nishizawa M, Kaibori M, Okumura T. AHCC® has protective effects in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. <i>J Surg Res</i> , accepted 5-30-2019.			
16. Hishikawa H, Kaibori M, Tsuda, T, Matsui K, Okumura T, Ozeki E, Yoshii K. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for			

gallbladder cancer. *Oncotarget*, accepted 6-16-2019.

②1.

Tsuda T, Kaibori M, Hishikawa H, et al. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosome has antineoplastic effects for hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2017; 31; 12(8): e0183527. doi:

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数)

無し

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

①2017 (H29)

1. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Hideyuki Matushima, Yusuke Nakamura, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, A-Hon Kwon.

Curcumin protects liver inflammation by suppressing iNOS induction in rat hepatocytes.

39th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism (Hague, The Netherlands; September 9-12, 2017)

2. Richi Nakatake, Yoshito Tanaka, Yousuke Ueyama, Hirokazu Miki, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Masanori Kon.

Alleviating effect of active hexose correlated compound prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy in rats.

25th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 8-9, 2017)

3. Yukinobu Ikeya, Sayuri Yokoyama, Yuka Yamamoto, Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa.

Constituents in perilla extract inhibit production of nitric oxide in rat hepatocytes.

25th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 8-9, 2017)

4. Dinia R. Dwijayanti, Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya, Mikio Nishizawa. Effects of the Extracts from Indonesian and Japanese Bitter Melons on the Nitric Oxide Production in Hepatocytes.

25th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 8-9, 2017)

5. 山内 優子, 奥山 哲矢, 奥村 忠芳, 池谷 幸信, 西澤 幹雄

ラット初代培養肝細胞におけるオウヒ成分の NF- κ B シグナル伝達経路への影響

第 40 回分子生物学会 (第 90 回日本生化学会) 神戸、12 月 6-9 日、2017.

6. 石井 寿成, 奥山 哲矢, 奥村 忠芳, 池谷 幸信, 西澤 幹雄

ソウジュツ中に含まれる一酸化窒素産生誘導を抑制する成分の探索

第 40 回分子生物学会 (第 90 回日本生化学会) 神戸、12 月 6-9 日、2017.

2018 (H30)

7. Dinia R. Dwijayanti, Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya, Mikio Nishizawa.

The anti-inflammatory effects of Indonesian and Japanese bitter melon (*Momordica charantia* L.) extracts in interleukin-1 β -treated hepatocytes.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

8. Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya.

Assessment of anti-inflammatory effects of Japanese Kampo medicine and functional foods.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

9. Richi Nakatake, Masaya Kotsuka, Yuki Hashimoto, Masahiko Hatta, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.

Glutathione inhibits the expression of proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

10. Yusuke Nakamura, Hiroya Iida, Richi Nakatake, Tsuma Sakaguchi, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Yoshinori Hamada, Takashi Doi.

L-Carnitine inhibits induction of inducible nitric oxide synthase gene expression in hepatocytes.

25th International Conference of Functional Food Center (Ibaraki, Japan, October 27-28, 2018)

11. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Hideyuki Matushima, Masaya Kotsuka, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Hiroaki Yanagimoto, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.

Curcumin protects liver inflammation by suppressing iNOS induction in rat hepatocytes.

26th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 21-22, 2018)

12. Tetsuya Okuyama, Chisa Takakura, Takae Kamimoto, Tadayoshi Okumura, Yukinobu Ikeya, Mikio Nishizawa.

Effects of the wolfberry (the fruits of *Lycium barbarum*) and their constituent on nitric oxide production in interleukin-1 β treated rat hepatocytes.

26th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 21-22, 2018)

13. Yukinobu Ikeya, Sayuri Yokoyama², Tetsuya Okuyama, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa.

Constituents in *Perilla* Extract Inhibit Production of Nitric Oxide in Rat Hepatocytes.

26th ICNIM (Internal Congress of Nutrition and Integrative Medicine) (Sapporo, Japan; July 21-22, 2018)

14. Masaya Kotsuka, Richi Nakatake, Yuki Hashimoto, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.
Glutathione inhibits expression of the proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.
40th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism (Madrid, Spain, 1-4 September, 2018)

15. Richi Nakatake, Hiroya Iida, Morihiko Ishizaki, Kosuke Matsui, Yusuke Nakamura, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura.
Metformin has a protective effect through the inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression in hepatocytes.
40th ESPEN Congress on Clinical Nutrition and Metabolism (Madrid, Spain, 1-4 September, 2018)

②

1. 菱川秀彦・高分子ミセル化 ICG を用いた胆嚢癌診断・治療の検討・蛍光 Navigation Surgery 研究会・東京・2018 年 4 月

2. 菱川秀彦・高分子ミセル化 ICG を用いた胆嚢癌診断・治療の検討・日本外科学会・大阪・2019 年 4 月

<特許申請・取得状況>

無し

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	形成外科学講座	事業推進者名	楠本 健司
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	皮膚・軟部組織の加齢変化、組織再生における分子イメージングによる病態解明と診断治療への応用		
キ ー ワ ー ド	再生 再建 創傷治癒 組織 細胞 皮膚 脂肪 骨 軟骨 神経 血管		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	28名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） <u>統括責任者</u> ：楠本健司 <u>実施責任者</u> ：鈴木健司、森本尚樹、日原正勝、覚道奈津子、畔熟行、益岡弘、竹川政裕、田中寧子、尾崎祐次郎、 <u>研究実施者</u> ：藤原奈都美、前田珠未、西村京子、福井充香、竹脇悠、櫻井裕章、木原雅志 胡内佑樹、前川恭慶（7名任期付助教） Sharon N、光井俊人、Tien Minh Le、馬園園（4名院生）原朋也、来方えん、尾川武史、Munisso MC、青樹美恵（5名研究生）			
研究成果の概要（平成29・30年度の研究成果について） 病態分子イメージングセンターでは、形成外科学講座は、皮膚・軟部組織の加齢性変化や種々の病的創傷治癒を病態分子イメージングで把握し、生理的皮膚・軟部組織や創傷治癒に向かわせることを目指している。この病態分子イメージングにより明らかにされる創傷治癒、細胞増殖、組織再生による基盤的現象を解明したエビデンスを応用して、種々の医療的手法により精度高く完成度の高い臨床的治療と生体の再建に導き、明らかな改善、治癒を導く方略を病態分子イメージングにて検証している。実際、再生医療等安全性確保法の申請、許可を得て、臨床研究を進める基盤としている。 平成29、30年度は、多血小板血漿（PRP）、脂肪組織由来幹細胞（ASCs）、高圧脱細胞化、骨再生、電場負荷での細胞・組織保存などで成果を挙げた。 <u>脂肪組織由来幹細胞（ASCs）</u> ASCsによる多分化能を明らかにし、骨、軟骨、脂肪などの組織再生により広い医学領域で応用可能であることを確認した。また、ASCsの生着性を明らかにし、将来の臨床応用対象である乳房再建での基盤となる応用対象の計測に関するエビデンスを得た。これを基盤に、再生医療等安全性確保法3種の臨床研究応用に進んでいる。 <u>多血小板血漿（PRP）</u> PRPを活性化し、ゼラチンスポンジ併用の埋入が創傷治癒に優れた結果を得ることを明らかにした。また、細胞内シグナル伝達についての経路を明らかにした。これらを基盤として、再生医療等安全性確保法3種の臨床研究応用に進んでいる。 <u>高圧脱細胞化</u> ：皮膚組織に200MPa負荷により、脱細胞して足場（scaffold）としての皮膚構築を目指す基盤を整え、巨大色素性母斑治療への特殊な加圧器を用いて具体的検証を開始した。再生医療等安全性確保法2種を推進している。また、皮膚悪性腫瘍の治療と皮膚再生への想定のもと、研究を開始している。 <u>骨再生</u> ：骨欠損や骨変形に対して hydroxyapatite（HAP）、bone morphogenetic protein（BMP）埋入による各種条件下の検討を行っている。HAPは材質的に組織親和性に優れ、形状の造形のための加工性にも富み、BMPの併用が期待される再建法であることを検証している。 <u>電場負荷条件での細胞組織の保存</u> ：電場負荷での細胞、組織の保存がより長期に行えることを示し、切断指再接着術への応用を想定し、微小血管の組織保存性を検証中である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	形成外科学講座	事業推進者名	楠本 健司
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) < 29年度> <u>覚道奈津子</u>, <u>森本尚樹</u>, <u>尾川武史</u>, <u>Lai Fangyuan</u>, <u>楠本健司</u> 脂肪幹細胞を用いた脂肪組織再生療法細胞 レフリー有り 49(2):96-98 2017. <u>覚道奈津子</u>, <u>森本尚樹</u>, <u>尾川武史</u>, <u>来方えん</u>, <u>楠本健司</u> 女性の乳がん術後乳房変形に対する幹細胞を用いたあたらしい再建法の開発 女性健康科学研究会誌 レフリー有り 6(1):35-38, 2017. <u>Kakudo N</u>, <u>Morimoto N</u>, <u>Ogawa T</u>, <u>Hihara M</u>, <u>Notodihardjo PV</u>, <u>Matsui M</u>, <u>Tabata Y</u>, <u>Kusumoto K</u> Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected into murine subcutis. Journal of tissue engineering and regenerative medicine レフリー有り 11(7):1941-1948 2017. <u>Morimoto N</u>, <u>Mahara A</u>, <u>Jinno C</u>, <u>Ogawa M</u>, <u>Kakudo N</u>, <u>Suzuki S</u>, <u>Kusumoto K</u>, <u>Fujisato T</u>, <u>Yamaoka T</u> An evaluation of the engraftment and the blood flow of porcine skin autografts inactivated by high hydrostatic pressure. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials レフリー有り 105(5):1091-1101 2017. <u>Kakudo N</u>, <u>Morimoto N</u>, <u>Ogawa T</u>, <u>Hihara M</u>, <u>Lai F</u>, <u>Kusumoto K</u> Adipose-derived stem cell (ASC)-enriched fat grafting: experiments using White rabbits and an automated cell processing apparatus. Medical molecular morphology レフリー有り 50(3):170-177. 2017. <u>楠本健司</u> 自己血小板血漿 (PRP) による皮膚再生 Derma レフリー無し 262:1-6. 2017. <u>Morimoto N</u>, <u>Mahara A</u>, <u>Jinno C</u>, <u>Ogawa M</u>, <u>Kakudo N</u>, <u>Suzuki S</u>, <u>Fujisato T</u>, <u>Kusumoto K</u>, <u>Yamaoka T</u>. The superiority of the autografts inactivated by high hydrostatic pressure to decellularized allografts in a porcine model. Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials レフリー有り 105(8):2653 2017. < 30年度> <u>Lai F</u>, <u>Kakudo N</u>, <u>Morimoto N</u>, <u>Taketani S</u>, <u>Hara T</u>, <u>Ogawa T</u>, <u>Kusumoto K</u>. Platelet-rich plasma enhances the proliferation of human adipose stem cells through multiple signaling pathways. Stem cell research & therapy レフリー有り 9(1):107 2018. <u>Kakudo N</u>, <u>Morimoto N</u>, <u>Ogawa T</u>, <u>Taketani S</u>, <u>Kusumoto K</u>. FGF-2 combined with bilayer artificial			

dermis composed of collagen matrix prompts generation of fat pad in subcutis of mice. Medical molecular morphology レフリー有り 2018.

Notodihardjo SC, Morimoto N, Kakudo N, Mitsui T, Le TM, Tabata Y, Kusumoto K. Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing. Regenerative Therapy レフリー有り 10:1 2018.

原 朋也, 覚道 奈津子, 森本 尚樹, 楠本 健司 高齢化社会における骨再生療法 骨形成タンパク質を用いた骨再生(Bone regenerative therapy in the aging society: especially bone regeneration using bone morphogenetic proteins) 関西医科大学雑誌 レフリー無し 69:19 2018.

Munisso MC, Morimoto N, Notodihardjo SC, Mitsui T, Kakudo N, Kusumoto K. Collagen/Gelatin Sponges (CGSs) Provide Both Protection and Release of bFGF: An In Vitro Study. BioMed research international レフリー有り 2019:4016351, 2019.

Notodihardjo SC, Morimoto N, Kakudo N, Mitsui T, Le TM, Tabata Y, Kusumoto K. Efficacy of Gelatin Hydrogel Impregnated With Concentrated Platelet Lysate in Murine Wound Healing. The Journal of surgical research レフリー有り 234:190 2019.

Le TM, Morimoto N, Mitsui T, Notodihardjo SC, Munisso MC, Kakudo N, Kusumoto K. The sustained release of basic fibroblast growth factor accelerates angiogenesis and the engraftment of the inactivated dermis by high hydrostatic pressure. PLoS ONE レフリー有り 14(2):e0208658 2019.

楠本健司:PRP 療法の安全管理とトラブルシューティング PEPARS レフリー無し 147:91-94, 2019.

<図書>(著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数)

<29年度>

Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Orbay H, Fujimura J, Ono S, Kakudo N, Kusumoto K, Hyakusoku H. Academic Press Adipose-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine 2017. 459-467

楠本健司 南江堂 再生医療：外科系医師が知っておくべき創傷治療のすべて 2017. 263-269

日原正勝, 楠本健司 メディカ出版 熱傷治療：形成外科の手術看護パーフェクトマニュアル 2017. 59-70.

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

<29年度>

田中義人, 尾崎裕次郎, 田中寧子, 岩宮 怜子, 鈴木健司, 坪田 優, 山本大悟, 楠本健司 乳房再建に用いた脂肪注入の多様な有用性と今後の展望 第 60 回日本形成外科学会総会・学術集会 大阪市 2017.04.

楠本健司 自己多血小板血漿 (PRP) 療法による皮膚再生 招待講演 第 116 回日本皮膚科学総会 仙台市 2017.06.

楠本健司 自己多血小板血漿 (PRP) 療法による若返り シンポジウム 第 17 回日本抗加齢医学会総会 東京 2017.06.

楠本健司 多血小板血漿 (PRP) 療法について -その原理と慢性潰瘍、シワ治療を中心に- 招待講演 第 35 回日本美容皮膚科学会総会・学術集会 大阪市 2017.07.

楠本健司 多血小板血漿 (PRP) : 総説 シンポジウム 第 35 回日本美容皮膚科学会総会・学術集会 大阪市 2017.07.

楠本健司 PRP 療法の基本原理と慢性創傷に対する治療 シンポジウム 第 7 回細胞再生医療研究会 神戸市 2017.08.

Sharon Claudia Notodihardjo, Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Toshihito Mitsui, Le Tien Minh, Kenji Kusumoto Efficacy of gelatin hydrogel-impregnated human platelet lysates in wound healing 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会 大阪市 2017.10.

覚道奈津子, 森本尚樹, 楠本健司 脂肪幹細胞を使用した再生医療のトランスレーショナル研究 シンポジウム 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会 大阪市 2017.10.

覚道奈津子, 森本尚樹, 日原正勝, 楠本健司 FGF-2 とアテロコラーゲンスポンジを用いたマウス皮下脂肪新生効果の検討 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会 大阪市 2017.10.

森本尚樹, 覚道奈津子, 楠本健司 細胞成長因子を保持、徐放可能な新規人工真皮～PRP担体としての可能性 第 9 回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会 大阪市 2017.11.

Sharon Claudia Notodihardjo, Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Toshihito Mitsui, Tien Minh Le, Kenji Kusumoto Efficacy of the Concentrated Plate Lysate-Impregnated Gelatin Hydrogel 第 9 回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会 大阪市 2017.11

来方えん, 覚道奈津子, 森本尚樹, 竹谷 茂, 原 朋也, 尾川武史, 楠本健司 Analysis of Cell Cycle and DNA Synthesis of Human Adipose Stem Cells Treated with Platelet Rich Plasma 第 9 回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会 大阪市 2017.11

森本尚樹, 竹脇 悠, 藤原奈都美, 前田珠未, 櫻井裕章, 竹川政裕, 光井俊人, 覚道奈津子, 日原正勝, 楠本健司 自家培養表皮を用いた色素性母斑治療の現況 第 111 回関西形成外科学会学術集会 和歌山市 2017.11.

前田珠未, 森本尚樹, 竹脇 悠, 櫻井裕章, 藤原奈都美, 竹川政裕, 益岡 弘, 覚道奈津子, 日原正勝, 楠本健司 後頭部巨大色素性母斑治療に自家培養表皮ジェイスを使用した一例 第 111 回関西形成外科学会学術集会 和歌山市 2017.11.

森本尚樹, 馬原 淳, 神野千鶴, 光井俊人, 覚道奈津子, 坂本道治, 鈴木茂彦, 楠本健司, 山岡哲二 色素性母斑に対する皮膚再生治療法～第二種再生医療等技術を用いた臨床研究 シンポジウム 第 47 回日本創傷治癒学会 京都市 2017.11.

来方えん, 覚道奈津子, 森本尚樹, 竹谷 茂, 原 朋也, 尾川武史, 楠本健司 Platelet-rich plasma enhances the proliferation of adipose stem cells through multiple signal pathways 第 47 回日本創傷治癒学会 京都市

2017.11.

光井俊人, 森本尚樹, 馬原 淳, 覚道奈津子, 楠本健司, 山岡哲二 高压処理による細胞死の機序についての検討第 47 回日本創傷治癒学会 京都市 2017.11.

<平成30年度>

森本尚樹, 光井俊人, 馬原 淳, 覚道奈津子, 日原正勝, 畔 熱行, 楠本健司, 山岡哲二 高压処理不活化母斑と自家培養表皮を用いた巨大色素性母斑に対する再生医療臨床研究 第 61 回日本形成外科学会総会・学術集会 福岡市 2018.

Naoki Morimoto, Toshihito Mitsui, Atsushi Mahara, Natsuko Kakudo, Tetsuji Yamaoka, Kenji Kusumoto A new strategy for the treatment of giant congenital melanocytic nevus using culture epithelial autograft (JACE®) 特別講演 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Tien Minh Le, Naoki Morimoto, Natsuo Kakudo, Toshihito Mitsui, Sharon Claudia Notodihardjo, Kenji Kusumoto The acceleration of angiogenesis into inactivated dermis by high hydrostatic pressure using the sustained release basic fibroblast growth factor 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Fangyuan Lai, Natsuko Kakudo, Naoki Morimoto, Shigeru Taketani, Tomoya Hara, Takeshi Ogawa, Kenji Kusumoto Platelet-rich Plasma Enhances the Proliferation of Human Adipose Stem Cells Through Multiple Signaling Pathways 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Natsuko Kakudo, Naoki Morimoto, Takeshi Ogawa, Masakatsu Hihara, Priscilla Valentin Notodihardjo, Makoto Matsui, Yasuhiko Tabata, Kenji Kusumoto Angiogenic effect of platelet-rich plasma combined with gelatin hydrogel granules injected into murine subcutis 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Satoshi Kushida, Natsuko Kakudo, Naoki Morimoto, Tomoya Hara, Takeshi Ogawa, Toshihito Mitsui, Kenji Kusumoto Platelet and growth factor concentrations in activated platelet-rich plasma: a comparison of seven commercial separation systems 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Sharon Claudia Notodihardjo, Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Toshihito Mitsui, Tien Minh Le, Yasuhiko Tabata, Kenji Kusumoto レフリー有り Efficacy of Gelatin Hydrogel Impregnated with Concentrated Platelet Lysate in Murine Wound Healing 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Maria Chiara Munisso, Naoki Morimoto, Kenji Kusumoto The bioactivity evaluation of basic fibroblast growth factor (bFGF) release in vitro from collagen/gelatin sponges 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Masakatsu Hihara, Natsuko Kakudo, Naoki Morimoto, Fangyuan Lai, Kenji Kusumoto, Tomoya Hara, Makoto Matsui, Junichiro Jo, Yasuhiko Tabata Improved viability of murine skin flaps using a gelatin hydrogel sheet combined with basic fibroblast growth factor (bFGF) 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Tamami Maeda, Naoki Morimoto, Kenji Kusumoto Efficacy of Cultured Epithelial Autograft after Curettage for Giant Congenital Melanocytic Nevus of the Head 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

Toshihito Mitsui, Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Atsushi Mahara, Kenji Kusumoto, Tetsuji Yamaoka The Evaluation of Apoptosis and Necrosis of Human Skin Cell Induced By High Hydrostatic Pressure 5th TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2018.09.

楠本健司 再生医療等安全性確保法と美容医療における社会的意義ーPRP 療法を中心にー シンポジウム 日本美容外科学会総会第 133 回学術集会 2018.10. 東京

Kenji Kusumoto The principle of PRP and the applications in aesthetic and plastic surgery 招待講演 TSAPS 2018 Annual Meeting Kaohsiung, Taiwan 2018.10.

光井俊人, 森本尚樹, 馬原 淳, 覚道奈津子, 楠本健司, 山岡哲二 高压処理による有棘細胞癌不活化の検討 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会 2018.11. 東京

覚道奈津子, 森本尚樹, 馬 園園, 来 方遠, 楠本健司 ヒト脂肪幹細胞における PLTMax Human Platelet Lysate(hPL)の増殖効果 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会 2018.11. 東京

森本尚樹, Maria Chiara Munisso, Sharon Claudia Notodihardjo, Tien Minh Le, 光井俊人, 覚道奈津子, 楠本健司 新規人工真皮に保持された bFGF の生理活性の検討 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会 2018.11. 東京

馬 園園, 覚道奈津子, 森本尚樹, 来 方遠, 楠本健司 Proliferation effect of fibroblast growth factor-2 on human adipose-derived stem cells 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会 2018.11. 東京

楠本健司, 森本尚樹, 覚道奈津子, 日原正勝, 福田 智, 三宅ヨシカズ, 笹尾卓史, 竹治幸大 多血小板血漿 (PRP) 療法による創傷治癒促進の原理と臨床応用 シンポジウム 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会 2018.11. 東京

Kenji Kusumoto Platelet-rich plasma and the autologous PRP therapy - the most effective and safe regenerative medicine in the lowest cost - 招待講演 the 2nd Japan-Thailand Symposium on Regenerative Medicine and Cell Therapy Bangkok, Thailand 2018.11.

光井俊人, 森本尚樹, 馬原 淳, 覚道奈津子, Tien Le Minh, Sharon Claudia Notodihardjo, 楠本健司, 山岡哲二 高压処理をした有棘細胞癌組織はマウス体内でどう変化するのか 第 18 回日本再生医療学会総会 2019.03 神戸市

覚道奈津子, 森本尚樹, 馬 園園, 来 方えん, 楠本健司 ヒト脂肪幹細胞における PLTMax® Human Platelet Lysate の増殖効果 第 18 回日本再生医療学会総会 2019.03 神戸市

＜特許申請・取得状況＞

特になし

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	皮膚科学講座	事業推進者名	岡本 祐之
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	炎症性皮膚疾患において皮膚に浸潤する炎症細胞の解析		
キ ー ワ ー ド	乾癬, サルコイドーシス, 即時型アレルギー, 単球, 好塩基球		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	7 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 岡本祐之：研究総括 神戸直智：研究指導 山崎文和：臨床検体の収集と準備 植田郁子：臨床検体の収集と準備 Nguyen, Chuyen Thi Hong（大学院生）：乾癬およびサルコイドーシス検体の解析 岸本 泉（大学院生）：即時型アレルギー検体の解析 Ly, Nguyen Thi My（大学院生）：サルコイドーシス検体の解析			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 1）乾癬病変局所における単球サブセット 平成 28 年度に引き続いて、乾癬における単球について検討を継続した。病変局所の皮膚では CD14 と CD16 を共に発現する単球は TNFα 陽性であり、乾癬の病態に深く関与することが示唆された。また末梢血中の単球に注目すると、乾癬の病勢を皮膚の症状を捉える PASI スコアの値と CD14 と CD16 を共に発現する intermediate 細胞の比率が相関して上昇しており、かつその細胞表面に発現する CD86 が病勢を反映していることが示唆された（論文業績 3）。 2）サルコイドーシスにおける病勢マーカーの同定と単球サブセット 平成 28 年度に引き続いて、サルコイドーシスの病勢を反映する血清マーカーを検索しつつ、末梢血における単球のサブセットと、組織における肉芽腫形成の関係について検討した。 サルコイドーシスの病勢マーカーとして血清中の TARC 値が上昇することを報告した。これは同じく病勢マーカーとして平成 28 年度の成果として報告した可溶性 IL-2 受容体よりも鋭敏であり、サルコイドーシスの従来のマーカーとして使用されてきた ACE やリゾチームよりも優れている可能性が示唆される。また、皮膚病変組織においては肉芽腫そのものが TARC を発現することを同定した（論文業績 2）。 末梢血中においてこの TARC 産生細胞として単球のサブセットに注目した解析に着手し、炎症に関わるとされる CD14 と CD16 を共に発現する intermediate 細胞に特異的に発現することを同定した（発表業績 2, 論文準備中）。 サルコイドーシスのモデルとして、NOD2 遺伝子の機能獲得型変異によって皮膚と関節、眼に肉芽腫を来すブラウ症候群の解析に着手し、患者から樹立した iPS 細胞を単球へと分化誘導した細胞を用いて、IFNγ の処置によって NOD2 の発現が誘導されるととともに、変異をもった細胞においてのみリガンド非依存性に NOD2 の活性化が起こり、各種炎症性サイトカインが産生される系を確立した（発表業績 1）。 3）即時型アレルギーにおける好塩基球の振る舞い ブリックテストやスクラッチテストといった皮膚に抗原を負荷する即時型アレルギー検査の代用試験として、末梢血の好塩基球に発現する CD203c の発現を指標とした検査方法を確立し、症例レベルでの検証を行った（発表業績 3 および 6）。この解析の中から、抗ヒスタミン薬に対して治療抵抗性を示す症例に対して臨床応用された抗 IgE 抗体である omalizumab によって病勢がコントロールされる症例の末梢血好塩基球の振る舞いを詳細に検討することで、特発性の蕁麻疹において組織へと移行する好塩基球の重要性が示唆された（論文業績 1）。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	皮膚科学講座	事業推進者名	岡本 祐之
<雑誌論文> (著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年) 1. <u>Kishimoto I</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Ly NTM</u>, <u>Nguyen CTH</u>, <u>Okamoto H</u>. Basophil count is a sensitive marker for clinical progression in a chronic spontaneous urticaria patient treated with omalizumab. <i>Allergol Int.</i> 2019 (in press), 査読あり 2. <u>Nguyen CTH</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Ueda-Hayakawa I</u>, <u>Kishimoto I</u>, <u>Ly NTM</u>, Mizuno K, <u>Okamoto H</u>. TARC expression in the circulation and cutaneous granulomas correlates with disease severity and indicates Th2-mediated progression in patients with sarcoidosis. <i>Allergol Int.</i> 67: 487-495, 2018, 査読あり 3. <u>Nguyen CTH</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Yamazaki F</u>, <u>Ueda-Hayakawa I</u>, <u>Kishimoto I</u>, <u>Okamoto H</u>. Up-regulated expression of CD86 on circulating intermediate monocytes correlated with disease severity in psoriasis. <i>J Dermatol Sci.</i> 90: 135-143, 2018, 査読あり <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 該当なし <学会発表> (発表者名・発表標題・学会名・開催地 (海外の場合は国名と都市名)・発表年月) 1. <u>Ly NTM</u>, <u>Kambe N</u>, Sito MK, <u>Okamoto H</u>. Blau patient-derived iPS cells reveal gain-of-function mutation of NOD2 selectively impairs its ligand. 第 47 回日本免疫学会学術集会, 福岡市, 2018/12 2. <u>Nguyen CTH</u>, <u>Ly NTM</u>, <u>Kishimoto I</u>, <u>Ueda-Hayakawa I</u>, Mizuno K, <u>Kambe N</u>, <u>Okamoto H</u>. Increased circulating intermediate monocytes correlated with severity markers and possibly involved in immune response by producing TARC in patients with sarcoidosis. <i>27th European Academy of Dermatology and Venereology (EADV) Congress</i>, フランス (パリ), 2018/9 3. <u>Kishimoto I</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Ly NTM</u>, <u>Nguyen CTH</u>, Goto H, Uetsu N, <u>Okamoto H</u>. Confirmed diagnosis of banana and kiwifruit allergy by basophil activation test with fresh squeeze: The first case report. <i>27th EADV Congress</i>, フランス (パリ), 2018/9 4. <u>Nguyen CTH</u>, <u>Ly NTM</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Yamazaki F</u>, <u>Ueda-Hayakawa I</u>, <u>Kishimoto I</u>, <u>Okamoto H</u>. Upregulated expression of CD86 on circulating intermediate monocytes correlated with disease severity in patient with psoriasis. <i>The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for investigative Dermatology</i>, 高知市, 2017/12 5. <u>Nguyen CTH</u>, <u>Ueda-Hayakawa I</u>, <u>Yamazaki F</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Okamoto H</u>. Elevated serum TARC/CCL17 level is correlated with disease severity in sarcoidosis patients. 第 116 回日本皮膚科学会総会, 仙台市, 2017/06 6. <u>Kishimoto I</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Nguyen CTH</u>, Matsuda T, Nomura Y, Uetsu N, <u>Okamoto H</u>. Protein contact dermatitis induced by cabbage with recurrent symptoms after oral intake. <i>26th EADV Congress</i>, スイス (ジュネーブ), 2017/9 7. <u>Nguyen CTH</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Ueda-Hayakawa I</u>, <u>Kishimoto I</u>, <u>Okamoto H</u>. Persistently elevated serum TARC/CCL17 level is associated with advanced pulmonary stages in sarcoidosis. <i>26th EADV Congress</i>, スイス (ジュネーブ), 2017/9 <特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	腎泌尿器外科学講座	事業推進者名	松田 公志
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	分子イメージングを用いた泌尿器科領域における組織幹細胞・がん幹細胞の解明		
キ ー ワ ー ド	組織幹細胞、がん幹細胞、BMI1		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	2 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割）			
駒井資弘：研究全般の実施、論文作成、学会発表			
松田公志：研究全体の統括			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について）			
平成 29 年度には、組織マイクロアレイ法を用いた膀胱がんの予後規定因子の検索（BMI1 を含めた種々の遺伝子について免疫染色を施行）を行い、BMI1 高発現している膀胱がんの予後が不良であることを突き止めた。以前、我々が報告した“生殖幹細胞は分化細胞よりも BMI1 の発現が高い”ことと矛盾しない結果であった。平成 30 年度にはデータをまとめ、現在、論文投稿準備中である。 さらに平成 29 年度から科研費基盤研究(C)のテーマである“腎不全進行克服に向けた腎臓における組織幹細胞階層構造解析”も研究しており、多色細胞系譜追跡法にて腎組織幹細胞にも BMI1 陽性細胞が関与している可能性を発見した。腎組織幹細胞の解明は、医療費を圧迫している原因の一つである透析患者数の減少に繋がる可能性があり社会的にも非常に重要である。現在は障害時の再生に BMI1 陽性細胞が関与するか研究中である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	腎泌尿器外科学講座	事業推進者名	松田 公志
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） 現在、“筋層浸潤性膀胱がんにおける BMI1 高発現は予後不良因子である”について投稿準備中である。 <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 該当なし <学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） 駒井資弘、木下秀文、徳山陽子、村上彰悟、島田誠治、中本喬大、吉田崇、小糸悠也、谷口久哲、三島崇生、吉田健志、矢西正明、安田鐘樹、渡邊仁人、杉素彦、上野博夫、<u>松田公志</u> BMI1 高発現は筋層浸潤性膀胱がんの予後予測因子 第 105 回日本泌尿器科学会総会 鹿児島 平成 29 年 4 月 23 日 <特許申請・取得状況> 該当なし			

研究成果報告書の概要

講 座 等 名	物理学教室	事業推進者名	楠本 邦子
所 属 部 門	代謝部門		
分担研究課題	細胞内機能と構造のイメージングに関する研究		
キ ー ワ ー ド	軟 X 線顕微鏡、透過型電子顕微鏡、細胞外代謝物、X 線吸収微細構造、化学状態		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	1 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、大学院生等のリストおよびそれぞれの役割） 楠本邦子（軟 X 線顕微鏡による細胞内機能イメージング, XAFS による細胞外代謝物の化学状態解析）			
研究成果の概要（平成 29・30 年度の研究成果について） 1. 軟 X 線顕微鏡による細胞内機能イメージング 化学固定や剥片化などの処理を行わない状態で、原核細胞オルガネラや細胞外代謝物を軟 X 線顕微鏡 (XM)で観察し、機能や状態のイメージングを目指している。フルフィールド透過 X 線顕微鏡と走査型透過 X 線顕微鏡を用い、細胞径 1μm 以下の原核細胞の代表として、微細シアノバクテリアを、化学固定や染色や薄片化などの試料調整を行うことなく観察してきた。 H29-H30 年度は、水源の水に、通常の浄水処理では取り除くことが困難なカビ種物質である 2-Methylisoborneol (2-MIB)を代謝物として湖水に排出するシアノバクテリア <i>Pseudanabaena foetida</i> (<i>Phormidium tenue</i>)の 2-MIB 代謝能と細胞内微細構造の関連を調べる研究を進めた。 XM 観察で、未処理の <i>P. foetida</i> 細胞内で形成されるポリリン酸顆粒体と推定される顆粒の数が、遅滞期 (lag phase)、対数期 (log phase)、静止期(stationary phase)、衰退期(phase of decline)で大きく変化する様子が観察された。比較検証のため、剥片化し染色した細胞を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察し、TEM でも培養周期によるポリリン酸顆粒体の違いを確認した。 溶存態の 2-MIB と粒子態の 2-MIB の産生能とこれらの結果に相関がみられたことから、2-MIB を産生できる細胞の識別と、2-MIB が湖水に排出される機構の解明することができた。成果をまとめるための追加実験と、共同研究者（滋賀県琵琶湖環境化学研究センター、京都市上下水道局）による調査のまとめを行っている。			
2. X 線吸収微細構造 (X-ray absorption fine structure: XAFS) による細胞外代謝物の化学状態分析 淡水に生息するシジミの貝殻は、外套膜から分泌される炭酸カルシウムの上に、殻皮とよばれる数から十数ミクロン程度の厚さの主には有機物からなる膜で覆われている。代謝物からなる殻皮は年輪のように成長とともに蓄積され、自己再生しない。よって、細胞外代謝物である殻皮中の特定物質の化学状態変化を調べることで、成長中の健康状態や環境変動を読み出す研究を H29 年度より開始した。貝殻と同様に外套膜の代謝物である殻皮に含硫アミノ酸が含まれることを、電子プローブマイクロアナライザー (EPMA)と XASF で初めて確認した。貝殻に年輪に対応する成長線に沿って、鉄が環境中と異なる化学状態で局在が確認された。殻皮に含まれる硫黄化合物の XAFS 分析を行い、生息環境の酸化還元状態の違いにより硫黄化合物の化学結合状態の違いがあることが分かった。特に、SS 結合の形成に明瞭な違いが確認できたので、現在、解析を進めている。 これらの成果は、H31 年に開催される Water and Environment Technology Conference 2019 (WET2019)で報告する。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	物理学教室	事業推進者名	楠本 邦子
<雑誌論文>（著者名・論文標題・雑誌名・レフェリー有無・巻・ページ・発行年） (1) <u>K. Takemoto</u>, M. Yoshimura, T. Ohigashi, Y. Inagaki, H. Namba and K. H Kihara, Application of soft X-ray microscopy to environmental microbiology of hydrosphere, Journal of Physics: Conference Series (JPCS), 査読有, 849, 012010-1-012010-4. 2017. <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 該当なし <学会発表>（発表者名・発表標題・学会名・開催地（海外の場合は国名と都市名）・発表年月） (1) 竹本邦子, 馬場大哉, 吉村真史, 瀬川有香, 田渕雅夫, 渡辺義夫, 太田俊明, 琵琶湖産シジミの殻皮中の硫黄と鉄の化学状態分析, 日本陸水学会, 岡山市, 2018/10/08 (2) 竹本邦子, 吉村真史, 馬場大哉, 太田俊明, XAFS を用いた琵琶湖産シジミの殻皮の化学形態解析, 第7回名古屋大学 シンクロトロン光研究センターシンポジウム, 愛知県名古屋市, 2018/01/19 (2) <u>竹本邦子</u>, 吉村真史, 大東琢治, 一瀬 諭 , 難波秀利 , 木原 裕, 軟X線顕微法によるカビ種物質産生藍藻 <i>Pseudanabaena foetida</i> (<i>Phormidium tenue</i>) の微細構造観察, 第26回日本バイオイメージング学会, 東京都八王子市, 2017/09/16 <特許申請・取得状況> 該当なし			

Ⅲ. 関西医科大学病態分子イメージングセンター規程

(設置)

第1条 関西医科大学に病態分子イメージングセンター(以下「センター」という。)を置く。

(目的)

第2条 センターは、基礎と臨床のトランスレーショナル研究発展のため、神経、がん、代謝の3研究グループと支援グループの研究体制を構築する。分子イメージングシステムを駆使して、患者と動物モデルの疾患の病態を分子から個体まで体系的に解明し、課題とする疾患の診断治療法の開発に結びつけることを目的とする。

(部門)

第3条 センターに次の部門を置く。

- (1) 神経部門
- (2) がん部門
- (3) 代謝部門

(教職員)

第4条 センターに専任教職員を1名置き、他の教職員は本学の教職員をもつて充て、兼務とする。ただし、本学教職員以外の者を嘱託として委嘱することができる。

(センター長)

第5条 センターにセンター長を置く。

- 2 センター長は、センターを管理し、その運営にあたる。
- 3 センター長は、大学院医学研究科委員会構成員から学長が任命する。
- 4 センター長の任期は2年とし、再任を妨げない。
- 5 センター長に欠員が生じたときの後任の任期は、前任の残任期間とする。

(副センター長)

第6条 センターに副センター長を置く。

- 2 副センター長は、センター長を補佐し、センター長不在のときは、その職務を代行する。
- 3 副センター長は、大学院医学研究科委員会構成員からセンター長が推薦し、学長が任命する。
- 4 副センター長の任期は2年とし、再任を妨げない。
- 5 副センター長に欠員が生じたときの後任の任期は、前任の残任期間とする。

(部門統括者)

第7条 第3条の部門に部門統括者(基礎系・臨床系)をおく。

- 2 部門統括者は、センター長と副センター長とが協議して大学院医学研究科委員会構成員の中から推薦し、学長が任命する。

- 3 部門統括者の任期は2年とし、再任を妨げない。
- 4 部門統括者に欠員が生じたときの後任の任期は、前任の残任期間とする。

(運営委員会)

第8条 センターに運営委員会を置く。

- 2 運営委員会は、次の者をもつて構成する。

- (1) センター長
- (2) 副センター長
- (3) 部門統括者6名

- 3 前項第1号及び第2号に掲げる委員の任期は、在任期間とする。
- 4 第2項第3号に掲げる委員の任期は2年とする。ただし、再任を妨げない。
- 5 運営委員会は、センターの円滑な運営をはかるために、次の事項を審議する。

- (1) センターの予算の審議
- (2) センター長が必要とする事項
- (3) センターにおける研究の充実並びに促進に関する事項
- (4) 研究の成果の活用に関する事項
- (5) その他センター運営に関する事項

- 6 センターの施設利用に関することは、総合研究施設に付託する。
- 7 運営委員会は、必要に応じてセンター長がこれを招集し、議長となる。
- 8 運営委員会の庶務は、大学事務部研究課において行う。

第9条 センターで行った研究成果は、紀要により外部の研究機関等に公表する。

- 2 紀要の作成は、原則2年間に1回とする。

(規程の改廃)

第10条 この規程の改廃は、センター運営委員会及び大学院医学研究科委員会の議を経て学長が決定する。

附 則

この規則は、平成23年8月1日から施行する。

センター設置初年度の運営委員会構成員任期の終期は、平成25年3月31日とする。

附 則

この規程は、平成29年2月15日から施行する。

附 則

この規程は、平成29年4月1日から施行する。

附 則

この規程は、平成30年4月1日から施行する。

病態分子イメージングセンター
平成29年度・平成30年度研究成果報告書
第4号
関西医科大学

令和元年10月