

関西医科大学

病態分子イメージングセンター

令和元（2019）年度・令和2（2020）年度
研究成果報告書

第5号

令和3（2021）年10月

はじめに

病態分子イメージングセンター センター長 中邨智之

生命科学においては日進月歩の勢いで数々の分子イメージング機器が開発され、いくつかは先端的研究に必須のものとなっていますが、多くは高価であり、各研究者が所有するよりも学内で共同利用するのが合理的です。本センターは、2011年に私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「分子イメージングによる体系的病態の解明と診断治療法の開発」が採択されたのを機に設立され、事業終了後も引き続き各種分子イメージングを用いた研究をサポートしています。質量分析顕微鏡、細胞イメージアナライザー、イメージングフローサイトメーター、小動物用SPECT/CT等の先端的な分子イメージング機器を運用しており、総合研究施設で共同利用している多光子顕微鏡をはじめとする数多くのイメージング機器、生化学的解析機器等と合わせて本学の生命科学・医学研究になくてはならない存在となっています。本センターでは神経部門、がん部門、代謝部門でそれぞれ参加講座の活発な研究が行われていますが、さらに部門や講座にとらわれない共同研究が活性化することを願っています。

I. 令和元（2019）年度・令和2（2020）年度の参加講座および研究課題

【参加講座数】

神経部門	9 講座
がん部門	9 講座
代謝部門	1 2 講座

【神経部門】

講座等名	事業推進者	研究課題名
解剖学講座	北田 容章	主要臓器の幹細胞及びその系譜細胞の分子イメージングによる正常及び病理組織解析
生理学講座	中村 加枝	情動による意思決定の変化の神経メカニズムの解明
医化学講座	清水(小林)拓也	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
iPS・幹細胞応用医学講座	六車 恵子	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
神経機能部門	小早川 令子	人工冬眠・生命保護作用の誘発原理の解明
細胞機能部門	小原 圭吾	海馬神経回路の光イメージング
神経内科学講座	日下 博文	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
皮膚科学講座	谷崎 英昭	炎症性皮膚疾患において皮膚に浸潤する好塩基球の解析 痒み誘発刺激における表皮内神経 in vivo イメージングとかゆみ伝達機構の解明
生物学教室	平野 伸二	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

【がん部門】

講座等名	事業推進者	課題名
実験病理学講座	上野 博夫	多色細胞系譜追跡法を用いた幹細胞の維持機構の解析
微生物学講座	藤澤 順一	HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた ATL 発症過程の解析
分子遺伝学部門	木梨 達雄	リンパ節のホーミングの分子機構に関する研究
モデル動物部門	李 成一	遺伝子改変マウスを用いた疾患発症機構の解明
内科学第一講座	野村 昌作	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
内科学第三講座	長沼 誠	慢性炎症と発癌に関する病態解明と治療戦略
外科学講座	海堀 昌樹	肝細胞癌に対する抗癌剤内包 PCL（ポリカプロラクトン）ファイバーシートを用いた新規局所治療デバイスの開発
腎泌尿器外科学講座	松田 公志	泌尿器科がん疾患における、転写因子 Ovol2 の発現と mesenchymal-epithelial transition (MET) との関連性に関する研究
臨床病理学講座	蔦 幸治	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

【代謝部門】

講座等名	事業推進者	課題名
薬理学講座	中邨 智之	細胞外マトリックス線維形成の加齢変化に関する研究
iPS・幹細胞再生医学講座	人見 浩史	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
衛生・公衆衛生学講座	神田 靖士	感染症の新規診断法の開発と骨粗鬆症に対する漢方製剤治療メカニズムの解明
法医学講座	赤根 敦	次世代シーケンサーを用いた法遺伝学研究
侵襲反応制御部門	広田 喜一	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
生体情報部門	松田 達志	Arf-mTORC1 軸を介した免疫制御機構の解明
ゲノム編集部門	徳弘 圭造	精巣特異的ミトコンドリア膜分子の機能解析
内科学第二講座	塩島 一郎	食後高血糖・高中性脂肪血症が骨髄機能に及ぼす影響
外科学講座	海堀 昌樹	誘導型一酸化窒素合成酵素発現を指標とした培養細胞および臓器障害モデル動物を用いた薬剤の保護効果とメカニズムの解析
形成外科学講座	楠本 健司	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
眼科学講座	高橋 寛二	全身疾患モデル動物における網膜新生血管発症様式を OCT アンギオグラフィで検討する（2019 年度） LTBP2 ノックアウトマウスを用いることによる落屑症候群の病態解明（2020 年度）
物理学教室	楠本 邦子	細胞外代謝物の X 線マイクロイメージングと X 線吸収微細構造分析（2019 年度） 軟 X 線による細胞外代謝物に含まれる微量元素の化学結合の違いを利用した可視化法の開発（2020 年度）

Ⅱ. 各事業推進者の「研究成果報告書の概要」・「病態分子イメージングセンターに係る業績」

1. 神経部門

解剖学講座	
生理学講座	
医化学講座	
iPS・幹細胞応用医学講座	
神経機能部門	
細胞機能部門	
神経内科学講座	
皮膚科学講座	
生物学教室	

研究成果報告書の概要

講座等名	解剖学講座	事業推進者名	北田 容章
所属部門	神経部門		
分担研究課題	主要臓器の幹細胞及びその系譜細胞の分子イメージングによる正常及び病理組織解析		
キーワード	分子イメージング、転写制御、非コード RNA とその機能		
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）			
主任教授：北田容章（神経科学系研究総括・組織学的解析）、准教授：田中進（婦人科学・泌尿器科学系研究総括・分子生物学的イメージング解析）、講師：加瀬政彦（組織学的解析）・平原幸恵（質量分析顕微鏡解析）・林真一（遺伝学的組織学解析）、助教：大江総一（分子生物学的イメージング解析）・小池太郎（組織学的解析・微細形態電子顕微鏡解析）・中野洋輔（組織学的解析）			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） 2019 年度・2020 年度において、以下の研究等を取扱った。			
シュワン細胞は末梢神経系のグリア細胞であるが、中枢神経系・末梢神経系への移植により軸索への髄鞘形成に加え、神経再生を支持する細胞として有用であり、再生医療への応用が期待されている。われわれは線維芽細胞に様々なサイトカインを経時的に作用させることで、シュワン細胞を誘導可能であることを示した。また、この誘導シュワン細胞を末梢神経切断モデルに移植することで、その神経再生支持機能と髄鞘形成能について証明した。			
SSEA-3 はヒト多能性幹細胞のマーカーとして用いられているが、生体内に存在する多能性幹細胞として Muse 細胞が挙げられる。われわれはヒト末梢血中に SSEA-3／CD45 両陽性細胞が存在することを見出した。この細胞は脳・骨格筋・肝といったそれぞれの臓器が傷害された免疫不全マウスへの移植により、それぞれの臓器特有の細胞へと分化をしたことから、ヒト末梢血 SSEA-3／CD45 両陽性細胞は Muse 細胞様の能力を示した。これらのことは、末梢血中には SSEA-3／CD45 両陽性細胞という、これまで知られていなかった性質を示すことを示唆している。			
子宮内膜に含まれる子宮 NK 細胞はらせん状動脈のリモデリングを促進し、免疫寛容を誘導する。一方、プロゲステンによって脱落膜化する子宮内膜間質細胞から分泌される IL15 が子宮 NK 細胞を活性化させるが、子宮内膜間質細胞において IL15 の発現を制御する転写因子は未同定であった。われわれは転写因子 HAND2 が子宮内膜間質細胞における IL15 の転写制御を制御していることを、定量的 RT-PCR、組織学的解析、ChIP-QPCR、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて明らかにした。これらの結果から、HAND2 は子宮内膜間質細胞において IL15 の転写を直接上昇させることを確認した。			
両側副腎腫瘍等における両側副腎摘出術においては、ステロイド補充の目的にて摘出副腎の健常部選択的自家移植を行うことがある。移植後副腎は内分泌能の再獲得までに時間を要するが、この過程において形態形成因子であるデザート・ヘッジホッグのびまん性発現上昇が重要であることを既に示している。このデザート・ヘッジホッグの発現制御因子は知られていなかったが、田中らは、転写因子 GATA4/6 がその一つとして重要な因子であることを明らかとした。			
睡眠覚醒は脳視床下部に存在するオレキシンにより制御されるが、オレキシンの転写制御機構は不明な点が多い。われわれはオレキシンニューロンに共存する転写制御因子 PLAGL1 を同定し、PLAGL1 がオレキシンの転写制御をおこなうことを培養細胞、マウス胎児、ならびにマウス成体を用いて証明した。			
視神経損傷マウスの網膜変化を組織化学的手法と質量顕微鏡を用い解析した。網膜では、細胞死を起こした神経節細胞と著しいアストロサイトの集積、活性化ミューラー細胞の発現を示していた。			

質量顕微鏡脂質解析においては、脂質分布層が著しく変化し、ドコサヘキサエン酸をもつホスファチジルエタノールアミンの量が上昇していた。視神経損傷は、RGC のみでなく網膜全層に影響を及ぼしていることを示し報告し、軸索伸長促進につながる手がかりを提供した。

再生は全ての脊椎動物で起こる現象であるが、その再生能力の高さは生物種ごとに大きく異なり、その中でも両生類や魚類では失われた器官を完全に再生することができる。DNA のメチル化とヒストンの修飾によるエピゲノム制御は細胞記憶を構築し、この細胞記憶に基づいて元と同じ器官が再生される。われわれは、これまでに積み上げられてきた細胞記憶と再生の関係に関する知見、各種器官再生における最新の分子メカニズムモデルを議論した。

近年、CPEB1 による mRNA 翻訳制御の重要性が報告されている。我々は、CPEB1 自身の転写後発現制御に着目し研究をおこなった。その結果、AUF1 が 3' UTR を介して CPEB1 発現を制御すること、AUF1 ノックダウンにより CPEB1 の mRNA レベルは増加しタンパク質レベルは低下することを明らかにした。これらの結果は、AUF1 が CPEB1 発現において正/負両方向性の役割を担う事を示している。

近年、長鎖非コード RNA (lncRNA) が複数の遺伝子の発現をエピジェネティック、転写、転写後の各段階で制御することが明らかになっている。本総説では、中枢神経系における神経細胞の分化、シナプス形成、シナプス可塑性に関わる遺伝子発現制御において、lncRNA が極めて重要な役割を果たしていることをまとめ、さらに、複数の lncRNA の発現異常が神経疾患の発症に関与していることも明らかにしている。

グリオーマがん幹細胞 (GSC) において特異的発現を示す非コード RNA の同定と機能解析をおこなうことでグリオーマ予後改善につながる新規治療法確立を目指している。これまで、遺伝子発現解析により MES 型 GSC 特異的高発現を示す長鎖非コード RNA (lncRNA) およびマイクロ RNA を複数同定している。さらに発現抑制実験等をおこないこれらの非コード RNA が GSC 細胞表現型を制御する可能性があることを明らかにしている。このテーマに関連し研究医養成コース学生 (3 年・柿崎梨緒、阪本純加) を指導し学会発表をおこなっている。

脳梗塞領域に出現する胆汁酸の合成機構と生理機能を解析することで脳梗塞病態における意義を明らかにし新規コレステロール代謝機構としての展開を目指している。これまで、完全梗塞モデルマウスを用いた胆汁酸合成酵素発現細胞の同定、ニューロンにおける胆汁酸合成酵素発現メカニズムの解析、質量顕微鏡による胆汁酸の直接的可視化等を行い、中枢神経系における胆汁酸合成メカニズムを明らかにしている。このテーマに関連し研究医養成コース学生 (5 年・和田早織) の指導をおこなっている。

Array tomography は連続超薄切片を用い三次元的超微形態を観察する手法であり、包埋後染色法を用いることが出来る。一方、correlative light and electron microscopy は、同一細胞の光学顕微鏡像と電子顕微鏡像を得る手法である。両手法を用い、同一細胞で三次元微細構造解析と免疫組織化学的解析をおこなう方法について、自身がおこなった実験を例にして述べた。

正常ラットの脊髄神経節において p75 を発現する細胞を、免疫組織化学・三次元電子顕微鏡法・correlative light and electron microscopy を用いて同定した。この細胞は複数の広汎性グリアマーカーに陽性であるが、既知のグリアと異なった形態を示し、神経節細胞の突起起始部周辺に局在していたことから、新規グリア細胞であることを明らかにした。

細胞やシナプスの微細な構造や機能を解明するため、「遺伝子の戦い」というコンセプトのもと、遺伝子組み換えによる複数のリコンビナーゼの競合を利用した解析手法を開発した。この手法では、複数の導入遺伝子の配分比率を調整することで、単一のシナプスを標識することができる。さらに、この新規遺伝子導入手技と拡大顕微鏡を組み合わせることで、海馬の全シナプス構造の 3 次元高解像度イメージングが可能となり、内在性シナプスタンパク質の可視化が実現した。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	解剖学講座	事業推進者名	北田 容章
<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) ※全てレフェリー有り <u>Kitada M</u>, Murakami T, Wakao S, Li G, Dezawa M Direct conversion of adult human skin fibroblasts into functional Schwann cells that achieve robust recovery of the severed peripheral nerve in rats. Glia, 67(5):950-966, 2019. <u>Tanaka S</u>, Honda Y, Takaku S, <u>Koike T</u>, Oe S, <u>Hirahara Y</u>, Yoshida T, Takizawa N, Takamori Y, Kurokawa K, Kodama T, Yamada H Involvement of PLAGL1/ZAC1 in hypocretin/orexin transcription. Int J Mol Med, 43(5):2164-2176, 2019. Umemoto, K, Naito M, Tano K, Terayama H, <u>Koike T</u>, Ohmichi M Ohmichi Y, Sakabe K, Nakano T Acupuncture Point "Hegu" (LI4) Is Close to the Vascular Branch from the Superficial Branch of the Radial Nerve. Evid Based Complement Alternat Med, 2019:Article ID 6879076 1-6, 2019. <u>Oe S</u>, Kimura T, Yamada H Regulatory non-coding RNAs in nervous system development and disease. Front Biosci (Landmark Ed), 24:1203-1240, 2019. 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. 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. <u>Koike T</u>, Tanaka S, Hirahara Y, Oe S, Kurokawa K, Maeda M, Suga M, Kataoka Y, Yamada H 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. Yoshida T, Takizawa N, Matsuda T, Yamada H, <u>Kitada M</u>, <u>Tanaka S</u> GATA4/6 regulate DHH transcription in rat adrenocortical autografts. Sci Rep, 10(1):446, 2020. <u>Hayashi S</u>, Tamura K, Yokoyama H Chromatin dynamics underlying the precise regeneration of a vertebrate limb - Epigenetic regulation and cellular memory. Semin Cell Dev Biol, 97:16-25, 2020. <u>Hirahara Y</u>, Wakabayashi T, <u>Koike T</u>, Gamo K, Yamada H Change in phospholipid species of retinal layer in traumatic optic neuropathy model. J Neurosci Res, 98(2):325-337, 2020. Iwata R, Lee JH, Hayashi M, Dianzani U, Ofune K, Maruyama M, <u>Oe S</u>, Ito T,			

ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma.

Neuro-oncol, 22(3):333-344, 2020.

Hashimoto T, Kawata M, Hirahara Y, Nishi M, Satoshi I, Matsuda K

Scaffold attachment factor B: distribution and interaction with ER α in the rat brain. Histochem Cell Biol, 153(5):323-338, 2020.

Sato T, Wakao S, Kushida Y, Tatsumi K, Kitada M, Abe T, Niizuma K, Tominaga T, Kushimoto S, Dezawa M

A Novel Type of Stem Cells Double-Positive for SSEA-3 and CD45 in Human Peripheral Blood.

Cell Transplant, 29:1-16, 2020.

Murata H, Tanaka S, Tsuzuki-Nakao T, Kido T, Kakita-Kobayashi M, Kida N, Hisamatsu Y, Tsubokura H, Hashimoto Y, Kitada M, Okada H

The transcription factor HAND2 up-regulates transcription of the IL15 gene in human endometrial stromal cells.

J Biol Chem, 295(28):9596-9605, 2020.

Hatta T, Shinagawa K, Kawakami J, Yamamoto N, Kitada M, Itoi E

Downsizing effect of a modular radial head prosthesis on the lateral collateral ligament of the elbow: A cadaveric study.

Clin Biomech, 80:105140, 2020.

Kohara K, Inoue A, Nakano Y, Hirai H, Kobayashi T, Maruyama M, Baba R, Kawashima C.

BATTLE: Genetically Engineered Strategies for Split-Tunable Allocation of Multiple Transgenes in the Nervous System.

iScience, 26:23(6):101248, 2020.

Oe S, Koike T, Hirahara Y, Tanaka S, Hayashi S, Nakano Y, Kase M, Noda Y, Yamada H, Kitada M

AUF1, an mRNA decay factor, has a discordant role in Cpeb1 expression.

Biochem Biophys Res Commun, 534:491-497, 2021.

Mutara H, Tanaka S, Okada H

Immune Tolerance of the Human Decidua.

J Clin Med, 10(2):351, 2021.

Matejovič A, Wakao S, Kitada M, Kushida Y, Dezawa M.

Comparison of separation methods for tissue-derived extracellular vesicles in the liver, heart, and skeletal muscle.

FEBS Open Bio, 11(2):482-493, 2021.

Yanagisawa D, Kato T, Taguchi H, Shirai N, Hirao K, Sogabe T, Tomiyama T, Gamo K, Hirahara Y, Kitada M, Tooyama I

Keto form of curcumin derivatives strongly binds to A β oligomers but not fibrils.

Biomaterials, 270:120686, 2021.

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、嫌悪刺激、ドパミン、セロトニン、背側縫線核、扁桃体、線条体			
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	安田正治	実験の遂行と解析
	同	講師	上田康雅	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	石井宏憲	実験の遂行と解析
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について）				
1）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明らかにするため、昨年度は、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、光応答とそれに伴う行動変化を確認し、組織的解析を行った。本年度は、再現性の確認と、セロトニン投射先の刺激効果も明らかにするため、5 倍の濃度の AAV ベクターをカニクイサル1頭の背側縫線核の中心に注入した。背側縫線核およびその投射先である大脳基底核黒質網様部・緻密部において光応答が見られ、眼球運動課題の行動変化を確認できた。				
2）異なる情動コンテキストによる認知行動の変化のメカニズムの解明				
情動は我々の認知行動に影響を与えるが、その神経機構は未だ不明な点が多い。我々はサルが情動指標となる自律神経応答を計測しつつ認知課題を行わせる動物モデルを開発した。課題では二者択一選択行動を行い、その試行間に正、負または中立の情動と関連付けた条件刺激を提示し、これにより認知行動中のサルの情動を継続して制御した。課題中は、瞳孔径、心拍（自律神経応答）に加え、情動とかかわりの深いとされるセロトニンニューロンが局在する背側縫線核からの神経活動計測を行った。2019・2020 年度においては新たにもう一頭のサルについての計測を行い、一頭目のサルにおいて得られていた結果と同様に、負の条件刺激提示下における瞳孔径の散大と心拍数の上昇が見られ、交感神経系優位の有効なストレス指標が得られた。二頭のサルから得られたニューロン活動から、背側縫線核ニューロンの持続的発火が、サルの情動と選択行動の両方を表現していること、そしてこれら情動と認知行動の表現が、時間依存的な相互作用を有することが明らかとなった。このことは、背側縫線核が、様々な情動下で適切な意思決定を行うための神経基盤であることを示唆する。現在論文執筆中である。				
3）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				
負の情動による意思決定機構の変化の神経メカニズムを明らかにするため、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。現在、再現性を確認するため、2頭目のサルにおいて神経活動・自律神経反応計測・ドパミン受容拮抗剤投与の実験を行っている。

4) 霊長類扁桃体における情動情報と社会的情報の処理メカニズムの解明

情動情報と社会的情報は密接に関連しているが、本来は独立した情報である。2つの情報の処理過程の神経メカニズムを明らかにするため、異なる情動状況(報酬多・少)と社会的状況(社会的・非社会的)の下で視覚刺激を提示しながら、サルに眼球運動を行わせる課題を開発した。視覚刺激の探索パターンを解析すると、より多くの報酬と関連付いた刺激や社会的刺激をより長く見ていた。また、視覚刺激に対する瞳孔径は、報酬が少ないより多い状況および非社会的状況より社会的状況において大きくなる傾向がみられた。以上の結果は、報酬が多い刺激や社会的刺激に興味を抱いていることを示唆する。さらに、社会的情動情報処理に関与が知られている扁桃体内の複数の核からニューロン応答を記録したところ、外側核には社会的状況の違いによって応答を変化させるニューロンが多く、一方、基底核や中心核には情動状況の違いによって応答を変化させるニューロンが多かった。この結果より、扁桃体は情動情報と社会的情報を別々に受け取り、異なる神経核で処理していることが示唆される。また、外側核ニューロンの応答は、瞳孔径の大きさと正の相関がみられた、この結果は、外側核ニューロン応答は、サルが社会的刺激を見ることによる交感神経の興奮を反映していることが示唆される。現在、再現性を確認するため、2頭目のサルにおいてニューロン活動記録の実験を行っている。

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) Hikosaka O, <u>Yasuda M, Nakamura K</u>, Isoda M, Kim HF, Terao Y, Amita H, Maeda K Multiple neuronal circuits for variable object-action choices based on short- and long-term memories. Proc Natl Acad Sci U S A.11(52) 26313-26320 (2019) 2) Nagai, Y., Nishitani, N., <u>Yasuda, M., Ueda, Y.</u>, Fukui, Y., Andoh, C., Shirakawa, H., Nakagawa, T., Inoue, K. I., Nagayasu, K., Kasparov, S., <u>Nakamura, K.</u> and Kaneko, S. Identification of neuron-type specific promoters in monkey genome and their functional validation in mice. Biochem Biophys Res Commun;518(4):619-24 (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>Yasuda, M., Ueda, Y., Nakamura, K.</u>・Combined representation of emotional salience and decision signals in primate dorsal raphe nucleus.・Society for Neuroscience・USA, Chicago・2019年10月 2) <u>安田正治、上田康雅、中村加枝</u>・(邦題)サル背側縫線核における情動と意思決定の協調表現(英題) Combined representation of emotional arousal and decision signals in primate dorsal raphe nucleus・第42回日本神経科学大会・新潟・2019年7月 3) <u>Kuraoka, K., Nakamura, K.</u>・Segregated and overlapped processing of social and reward information in the primate amygdala.・Society for Neuroscience・USA, Chicago・2019年10月 4) <u>倉岡康治、中村加枝</u>・(邦題)サル扁桃体における社会的情報と情動情報の表現(英題) Representation of social and emotional information in primate amygdala・第42回日本神経科学大会・新潟・2019年7月 5) <u>倉岡康治、中村加枝</u>・(邦題)サル扁桃体の社会的情報と報酬情報の処理において、興奮性応答は抑制性応答よりも有意である(英題) Preferential processing of social and reward information by positively-, rather than negatively-responsive neurons in primate amygdala・第43回日本神経科学大会・神戸・2020年7月 <特許申請・取得状況> なし			

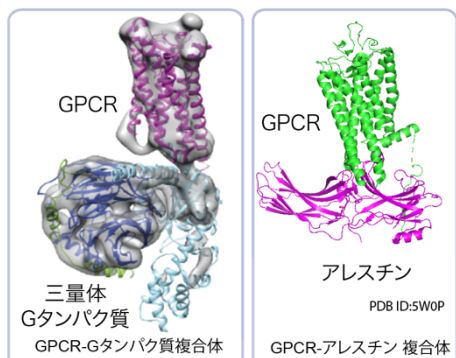
研究成果報告書の概要

講座等名	医化学講座	事業推進者名	清水（小林）拓也
所属部門	神経部門		
分担研究課題	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		
キーワード	慢性疼痛、膜タンパク質、構造生物学		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	11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） 教授 小林拓也（研究総括）、准教授 片野泰代（疼痛関連分子のプロテオミクス解析）、松村伸治（疼痛に関わる脊髄イメージング）、講師 中川 学（生化学分析）、寿野良二（膜タンパク質の構造解析）、助教 西田和彦（脊髄投射神経の発生学的解析）、井上明俊（痒み分子の構造解析）、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）、大学院生 寿野千代（膜タンパク質の発現および精製）、高井朋代（膜タンパク質の発現および精製）			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） （1）内臓痛の伝達に關与する脊髄後角神経回路の同定 体性感覚の伝達に關与する脊髄後角神経回路は近年徐々に明らかになってきたが、一方で内臓感覚の伝達経路については不明な点が多い。そこで本研究ではデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）の飲水投与による潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いて内臓痛を誘導し、このモデルマウスの脊髄後角での神経活動パターンを解析した。DSS モデルマウスの脊髄での神経活動を抗 c-fos 抗体を用いた免疫染色により解析した結果、c-fos 陽性細胞は第 6 腰髄から第 1 仙髄にかけてをピークとして存在し、脊髄後角の I 層を中心とした浅層に分布していた。この分布パターンはホルマリンの皮内注入による皮膚疼痛刺激に応答する神経活動パターンと異なる点が認められ、体性感覚と内臓感覚で脊髄での伝達経路が異なることが示唆された。 （2）シグナル伝達機構およびリガンド結合様式の解明 様々な G タンパク質共役受容体（GPCR）のクライオ電子顕微鏡単粒子解析（Cryo-EM SPA）による構造解析を行っている（図 1）。2 種のプロスタグランジン受容体 EP3, EP4 と G タンパク質との複合体を調製し、Cryo-EM SPA によって構造決定した（図 2）。EP3, EP4 はそれぞれ共役する G タンパク質の種類が異なり、それぞれが共役する Gi/o, Gs との複合体を調製し、構造決定した（Nojima S., et al., <i>Structure</i> (2020)、論文投稿準備中）。申請者らはすでに EP4 では不活性構造を、EP3 では内在性リガンド結合型の構造を決定しており、新たに決定した G タンパク質結合型（活性化状態）構造と比較することによって、EP4 の活性化機構及び EP3, EP4 と G タンパク質の結合様式を明らかにした。また EP3-Gi, EP4-Gs 複合体構造を比較し、シグナルアッセイを指標とした変異体解析により、プロスタグランジン受容体の G タンパク質選択性に ICL2 を含む受容体と G タンパク質の界面の特定のアミノ酸が重要であることを明らかにした（論文投稿準備中）。プロスタグランジン受容体以外についても数種の GPCR のプロジェクトを推進している。単体および①と同様の G タンパク質との複合体を調製して、Cryo-EM SPA もしくは X 線結晶構造解析による構造決定を目指し、現在それぞれサンプルの精製には成功している。今後は構造決定を目指して構造解析に適したサンプルの条件検討を行う予定である。 （3）スチリペントールの L5 脊髄神経切断モデルマウスの神経障害性疼痛緩和の作用機序 抗癲癇薬は癲癇だけでなく神経障害性疼痛の除痛薬として処方されるが、その作用機構は不明な点が多い。ドラベ症候群で有効な抗癲癇薬であるスチリペントールは、近年、アストロサイトの乳酸デヒドロゲナーゼの阻害剤として作用することが明らかとなっている。本研究では、L5-脊髄神経切断（L5-SNT）マウスモデルの神経障害性疼痛に対するスチリペントールの効果を調べた。ガバペンチンやカルバマゼピンなどの他の抗痙攣薬と同様に、スチリペントールは、L5-SNT の 7 日後にマウスに髄腔内投与した場合、用量依存的に L5-SNT 誘発性の機械的痛覚過敏を軽減した。同様に、幅広いモノカルボン酸トランスポーター阻害剤である α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸は、			

L5-SNT によって誘発される機械的痛覚過敏を軽減した。乳酸の同時投与は、スチリペントール、カルバマゼピン、または α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸による鎮痛効果を無効化したが、ガバペンチンによる鎮痛効果は無効化しなかった。抗痙攣薬はいずれも、脊髄後角のアストロサイトの活性化状態に影響を与えませんでした。以上のことから、スチリペントールが神経障害性疼痛に有効であることを、アストロサイト-ニューロン間の乳酸シャトルが神経障害性疼痛に関与していることを示唆した。

**迅速なGPCR複合体構造解析プラットフォームの構築と
構造情報に基づいた合理的なリガンドの開発**

① Cryo-EM単粒子解析



Gタンパク質を介した
シグナル伝達の分子機構の解明

アレスチンを介した
シグナル伝達の分子機構の解明

② in silico&シグナルアッセイスクリーニング

バイアス作動薬、選択的リガンドなどの新規薬剤開発
(Cryo-EM構造情報をもとにした化合物設計)

③Cryo-EM SPA/X線結晶構造解析

- 新規化合物との複合体高分解能構造の決定
- Cryo-EM構造をもとにして結晶構造解析のための
コンストラクトを探索、高分解能構造決定
→精密なリガンド結合様式の解明

図1

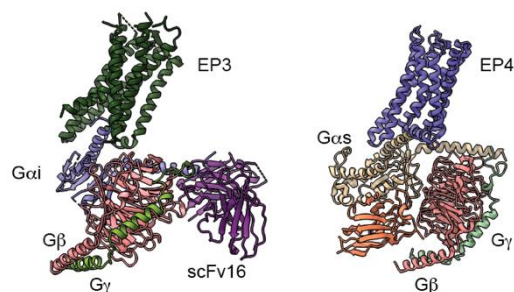


図2 プロスタグランジン受容体-Gタンパク質複合体の
クライオ電子顕微鏡単粒子解析

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	小林（清水） 拓也
<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. 清水 拓也[小林]・プロスタノイド受容体の構造解析を目指して・生化学・査読有・91(4):451-459・2019 2. 中川学・南米ペルー産タルウィ豆を用いたテンペ・日本テンペ研究会誌・査読無・16:5-8・2019 3. Nomura S, Kitami A, Takao-Kawabata R, Takakura A, Nakatsugawa M, Kono R, <u>Maeno A</u>, Tokuda A, Isogai Y, Ishizuya T, Utsunomiya H, Nakamura M.・Teriparatide Improves Bone and Lipid Metabolism in a Male Rat Model of Type 2 Diabetes Mellitus.・Endocrinology・査読有・160(10):2339-2352・2019 4. Kota Katayama, Kohei Suzuki,<u>Ryoji Suno</u>, Hirokazu Tsujimoto, So Iwata, <u>Takuya Kobayashi</u>, Hideki Kandori・Ligand binding-induced structural changes in the M2 muscarinic acetylcholine receptor revealed by vibrational spectroscopy・Journal of physical chemistry letters・査読有・10(22):7270-7276・2019 5. Pham VM, <u>Matsumura S</u>, <u>Katano T</u>, <u>Funatsu N</u>, Ito S.・Diabetic neuropathy research: from mouse models to targets for treatment.・Neural regeneration research・査読有・14(11):1870-1879・2019 6. Nakagita T, Ishida A, Matsuya T, <u>Kobayashi T</u>, Narukawa M, Hirokawa T, Hashimoto M, Misaka T・Structural insights into the differences among lactisole derivatives in inhibitory mechanisms against the human sweet taste receptor.・PloS one・査読有・14(3):e0213552・2019 7. Asada H, Inoue A, Ngako Kadji FM, Hirata K, Shiimura Y, Im D, Shimamura T, Nomura N, Iwanari H, Hamakubo T, Kusano-Arai O, Hisano H, Uemura T, <u>Suno C</u>, Aoki J, Iwata S.・The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone.・Structure.・査読有・28:1-8・2019 8. Katayama K, <u>Suno R</u>.・The Biophysical Society of Japan (BSJ) - Miyazaki Meeting, September 2019 Session 1 SHP-frontier of structure-function studies to unveil diverse GPCR signaling・Biophysical reviews・査読有・:2020 Apr 17.Online ahead of print.・2020 9. Kensuke Suzuki, Hiroshi Iwai, Keita Utsunomiya, Yumiko Kono, Yoshiki Kobayashi, Dan Van Bui, Shunsuke Sawada, Yasutaka Yun, Akitoshi Mitani, Naoyuki Kondo, <u>Tayo Katano</u>, Noboru Tanigawa, Tomoya Akama, Akira Kanda・Combination therapy with lenvatinib and radiation significantly inhibits thyroid cancer growth by uptake of tyrosine kinase inhibitor・Experimental Cell Research・査読有・398(1):112390・2020 10. Shiimura Y, Horita S, Hamamoto A, Asada H, Hirata K, Tanaka M, Mori K, Uemura T, <u>Kobayashi T</u>, Iwata S and Kojima M.・Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode.・Nature communications・査読有・(11):1-9・2020 11. Miyagi H, Asada H, Suzuki M, Takahashi Y, Yasunaga M, <u>Suno C</u>, Iwata S, Saito JI.・"The discovery of a new antibody for BRIL-fused GPCR structure determination"・SCIENTIFIC REPORTS・査読有・10(1):11669・2020 12. Keigo K*, Akitoshi I*, Yousuke N, Hirokazu H, <u>Takuya K</u>, Masato M, Ryosuke B, Chiho K （# corresponding author）（*equally contributed）・"BATTLE: Genetically Engineered Strategies for Split-Tunable Allocation of Multiple Transgenes in the Nervous System"・iScience・査読有・23(6):101248・2020 13. Nojima S, Fujita Y, Kimura KT, Nomura N, <u>Suno R</u>, Morimoto K, Yamamoto M, Noda T, Iwata S, Shigematsu H and <u>Kobayashi T.</u>・"Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G protein"・Structure・査読有.2020 Nov 21.S0969-2126(20)30419-6 <図書>（著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数） 1. <u>小林拓也</u>・プロスタノイド受容体の構造解析を目指して・日本生化学会・生化学・2019・1-10 <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>前野寛大</u>, 金折賢二, 赤坂一之・“高圧 NMR および顕微鏡法を用いた細菌芽胞における低圧殺菌効果の検証”・第 60 回高圧討論会・札幌・2019/10/23 2. Satoshi Yasuda, Yuta Kajiwara, Yuki Takamuku, Nanao Suzuki, Yosuke Toyoda, Kazushi Morimoto, <u>Ryoji Suno</u>, So Iwata, <u>Takuya Kobayashi</u>, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita・Theoretical prediction of thermostabilizing mutations for GPCR: Identification of hot-spot residues to be mutated common in class A GPCRs・第 57 回日本物理学会年会・宮崎市・2019/09/24			

3. 寿野良二, Lee Sangbae, 前田将司, 安田賢司, 山下恵太郎, 平田邦生, 村田武士, 木下正弘, 山本雅貴, Kobilka Brian, Vaidehi Nagarajan, 岩田想, 小林拓也・理論計算による熱安定化ムスカリン M2 受容体の選択的アンタゴニスト AF-DX384 結合型構造・第 57 回日本物理学会年会・宮崎市・2019/09/24
4. 寿野良二, Lee Sangbae, 前田将司, 安田賢司, 山下恵太郎, 平田邦生, 村田武士, 木下正弘, 山本雅貴, Kobilka Brian, Vaidehi Nagarajan, 岩田想, 小林拓也・理論計算による熱安定化ムスカリン M2 受容体の選択的アンタゴニスト AF-DX384 結合型構造・第 92 回日本生化学会大会・横浜市・2019/09/18
5. ◎中川 学・南米ペルー産 タルウィ豆を使ったテンペ・日本テンペ研究会 2019 年度大会・埼玉県坂戸市・2019/08/17
6. 西垣悦代, 西屋克己, 中川学, 前野寛大, 唐牛祐輔・医学生に対するマインドフルネスプログラムの開発と評価・第 51 回日本医学教育学会大会・京都・2019/07/27
7. 西田 和彦, 伊藤 誠二・脊髄後角長距離介在ニューロンの分子マーカーの同定・第 42 回日本神経科学大会/第 62 回日本神経化学大会・新潟市・2019/07/26
8. 片野泰代, 今野幸太郎, 西田和彦, 渡辺雅彦, 崎村建司, 小林拓也, 伊藤誠二・脊髄後角における疼痛関連タンパク BEGAIN 陽性細胞の機能的特徴・第 42 回日本神経科学大会/第 62 回日本神経化学大会/NEURO2019・新潟市・2019/07/25
9. ◎清水 (小林) 拓也・プロスタノイド受容体の構造解析を目指して・第 15 回 GPCR 研究会・東京都・2019/05/25
10. ◎Katano, T., Konno, K., Nishida, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Ito, S. and Kobayashi, T.・Expression analysis of BEGAIN mRNA and protein in the nervous systems.・49th annual meeting of the Society for Neuroscience.・Chicago, USA・2019/10/19
11. ◎Kazuyuki Akasaka, Akihiro Maeno, Kenji Kanaori・“High pressure NMR spectroscopy: An indispensable tool for protein studies and beyond”・10th International Meeting on Biomolecule under Pressure・Dortmund (Germany)・2019/09/29
12. ◎Miho Kakui, Akihiro Maeno, Kenji Kanaori, Kazuyuki Akasaka・Inactivation of microorganisms by high pressure processing on food materials in Japanese lunch box・10th International Meeting on Biomolecule under Pressure・Dortmund (Germany)・2019/09/29
13. ◎Ryoji Suno, Sangbae Lee, Shoji Maeda, Satoshi Yasuda, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Shoichiro Horita, Maki S Tawaramoto, Hirokazu Tsujimoto, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita, Masaki Yamamoto, Brian K Kobilka, Nagarajan Vaidehi, So Iawata, Takuya Kobayashi・Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor・第 19 回日本蛋白質科学会 年会・神戸市・2019/06/24
14. ◎Ryoji Suno, Sangbae Lee, Shoji Maeda, Satoshi Yasuda, Keitaro Yamashita, Kunio Hirata, Shoichiro Horita, Maki S Tawaramoto, Hirokazu Tsujimoto, Takeshi Murata, Masahiro Kinoshita, Masaki Yamamoto, Brian K Kobilka, Nagarajan Vaidehi, So Iawata, Takuya Kobayashi・Structural insights into the subtype-selective antagonist binding to the M2 muscarinic receptor・Cold Spring Harbor Conference・Suzhou, China・2019/05/06
15. 土居雅夫・清水 (小林) 拓也・寿野良二・三量体 G 蛋白質-GEF-GAP シグナル・第 93 回日本生化学会大会・Web 開催・2020/09/15
16. 片野泰代・阿部学・渡辺雅彦・崎村建司・伊藤誠二・小林拓哉・脊髄における BEGAIN 陽性介在ニューロンの可視化・第 43 回日本神経科学大会・Web 開催・2020/07/29
17. ◎小原圭吾, 井上明俊, 中野洋輔, 平井宏和, 小林拓也, 丸山正人, 雲財知, 馬場亮輔, 川島千穂・「遺伝子組換え酵素の戦い」と反発分離調節的な遺伝子発現を実現する新規の実験戦略・第 43 回日本神経科学大会・Web 開催・2020/07/31

<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	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） 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 渡辺 祥司（助教）：研究の遂行と解析 次山ルシラ絵美子（博士研究員）：研究の遂行と解析 亀井 孝昌（大学院生）：研究の遂行と解析			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） ヒト多能性幹細胞（ES 細胞・iPS 細胞）からヒト脳オルガノイド（脳様組織体）を作製し、組織学的、生理学的、分子遺伝学的な解析を実施した。疾患特異的 iPS 細胞の活用と関連技術の革新を進めることにより、ヒト脳の発生原理と機能発現の機序を解明し、神経疾患の克服につながることを目指した。			
ヒト iPS 細胞から作製した脳オルガノイドによる表現型解析と技術開発			
(1) 細胞および組織の破綻機序を解析するため、患者由来 iPS 細胞を樹立した。当該年度内では、神経変性疾患・神経筋疾患・視覚系難病を中心に 10 症例以上の難治性疾患患者を対象とした。これまでに樹立済みの疾患特異的 iPS 細胞とともに活用し、開発済みの自己組織的立体培養法 SFEBq 法により大脳・小脳・神経網膜・下垂体など様々な領域の脳オルガノイドを分化誘導した。健常者由来と患者由来の表現型を比較・解析を進め、各疾患の病態モデル化、発症機序の解明を目指した。なお、iPS 細胞の樹立は、学内および学外機関との共同研究の下、各機関の倫理審査承認計画の下で実施した。これらの成果は、原著論文 4 報、総説 1 報として報告した。			
(2) 技術開発として、細胞特異的蛍光レポータータンパクノックイン iPS 細胞株、カルシウムイメージング用 iPS 細胞株、細胞形態解析用マルチカラー発現 iPS 細胞株、細胞特異的マスター遺伝子導入 iPS 細胞株などを作製した。また、学外機関との共同研究として、脳オルガノイドへ血管網形成を目的に、マイクロ流体デバイスを開発中である。成果の一部は国内外の学会において報告した。			
(3) 小脳オルガノイドを活用した脊髄小脳変性症研究で共同研究を実施している、ロチェスター大学医歯学部生化学生物物理学専攻 黒崎辰昭准教授をお招きし、学内セミナーを開催した。演題名は「Nonsense-mediated mRNA decay: Quality and quantity control of gene expression in health and disease(ナンセンス変異依存 mRNA 分化機構による mRNA 発現管理と遺伝性神経疾患)」(2019 年 4 月 8 日)。			

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>Atsushi Tamada, Shoji Watanabe, Keiko Muguruma</u>. Investigating developmental and disease mechanisms of the cerebellum with pluripotent stem cells. <i>Molecular and Cellular Neuroscience</i>, 107, 2020, 査読有 2) Kazuma Kamata, Yuki Otsuka, Keiko Imamura, Akio Oishi, Takayuki Kondo, Mika Suga, Ran Shibukawa, Yasue Okanishi, Yukako Sagara, Kayko Tsukita, Tsutomu Yasukawa, Hideaki Usui, <u>Keiko Muguruma</u>, Akitaka Tsujikawa, Haruhisa Inoue. Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi005-A, derived from a Best disease patient with BEST1 mutations. <i>Stem Cell Research</i>, 45: 101782-101782, 2020, 査読有 3) Kazuma Kamata, Yuki Otsuka, Keiko Imamura, Akio Oishi, Takayuki Kondo, Mika Suga, Ran Shibukawa, Yasue Okanishi, Yukako Sagara, Kayko Tsukita, Tsutomu Yasukawa, Hideaki Usui, <u>Keiko Muguruma</u>, Akitaka Tsujikawa, Haruhisa Inoue. Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi004-A, derived from a patient with age-related macular degeneration. <i>Stem Cell Research</i>, 45: 101787-101787, 2020, 査読有 4) Ryusaku Matsumoto, Hidetaka Suga, Takashi Aoi, Hironori Bando, Hidenori Fukuoka, Genzo Iguchi, Satoshi Narumi, Tomonobu Hasegawa, <u>Keiko Muguruma</u>, Wataru Ogawa, Yutaka Takahashi. Congenital pituitary hypoplasia model demonstrates hypothalamic OTX2 regulation of pituitary progenitor cells. <i>Journal of Clinical Investigation</i>, 130(2): 641-654, 2020, 査読有 5) Yohei Isshiki, Taikopaul Kaneko, <u>Atsushi Tamada, Keiko Muguruma</u>, Ryuji Yokokawa. Co-culture of a brain organoid derived from human iPSCs and vasculature on a chip. <i>The 33rd IEEE International conference on microelectron mechanical systems (MEMS 2020)</i>, 1024-1027, 2020, 査読有 6) Keitaro Kanie, Hironori Bando, Genzo Iguchi, <u>Keiko Muguruma</u>, Ryusaku Matsumoto, Ryoko Hidaka-Takeno, Yasuhiko Okimura, Masaaki Yamamoto, Yasunori Fujita, Hidenori Fukuoka, Kenichi Yoshida, Kentaro Suda, Hitoshi Nishizawa, Wataru Ogawa, Yutaka Takahashi. Pathogenesis of Anti-PIT-1 Antibody Syndrome: PIT-1 presentation by HLA class I on anterior pituitary cells, <i>Journal of the Endocrine Society</i>, 3(11): 1969-1978, 2019, 査読有 7) Ishikawa Y, Okada M, Honda A, Ito Y, <u>Tamada A</u>, Endo N, Igarashi M. Phosphorylation sites of microtubule-associated protein 1B (MAP 1B) are involved in axon growth and regeneration, <i>Molecular Brain</i>, 12(1): 93, 2019, 査読有 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 1) <u>六車恵子</u>: iPS細胞を用いた小脳の発生と病態の解明, <i>Clinical Neuroscience</i> 37(8): 1011-1014, 2019. 2) <u>六車恵子</u>, 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. <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>六車恵子</u>, 多能性幹細胞の試験管内神経分化: あらたな可能性と今後の課題, 日本薬学会 東海支部 特別講演会, 2020年, 名古屋市(招待講演) 2) <u>六車恵子</u>, iPS細胞を用いた基礎研究, 第50回日本臨床神経生理学会学術大会 大会記念シンポジウム, 2020年, 京都市(招待講演) 3) Maneesha Shaji, <u>Atushi Tamada, Keiko Muguruma</u>, Stanislav L. Karsten, Ryuji Yokokawa, Effect of vasculature on differentiation of brain organoids grown in 3D vascular assay, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会, 2020年, オンライン 4) Yohei Isshiki, Taikopaul Kaneko, <u>Atsushi Tamada, Keiko Muguruma</u>, Ryuji Yokokawa, Co-culture of a brain organoid derived from human iPSCs and vasculature on a chip. <i>The 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS)</i>, 2020年, カナダ, バンクーバー 5) 蟹江慶太郎, 井口元三, 伊藤剛, 喜多山秀一, 坂東弘教, <u>六車恵子</u>, 松本隆作, 山本雅昭, 福岡秀規, 金子新, 小川渉, 高橋裕, 疾患 iPS 細胞/抗原特異的 T 細胞を用いた抗 PIT-1 下垂体炎疾患モデルの樹立, 日本臨床分子医学会学術総会プログラム・抄録集 57 回 78-78, 2020 年(新型コロナウイルス禍のため開催中止) 6) <u>六車恵子</u>, iPS細胞を用いた神経疾患研究, 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ, 2019年, 福岡市 <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	人工冬眠・生命保護作用の誘発原理の解明		
キーワード	人工冬眠、生命保護、先天的恐怖臭		
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） 人工冬眠・生命保護作用誘発原理の解明の実施：小早川令子， 小早川高， 松尾朋彦， 林勇一郎， 土井昭宏，唐麗君，安田亜衣子，金河大			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） 先天的恐怖は、危機的状況下での生命維持に密接に関係しているが、その関係は完全には解明 されていない。本研究では、超正常先天的恐怖誘導物質であるチアゾリン類恐怖臭（tF0）の一種 である 2-methyl-2-thiazoline (2MT) による刺激は、後天的恐怖刺激とは異なり、全身の低体温・ 低代謝を誘導すると共に、致死的な低酸素環境下での長期生存を可能にすることを明らかにした。 2MT 刺激はピルビン酸デヒドロゲナーゼのリン酸化を介して好気性代謝を抑制し、この代謝変動 が低酸素抵抗性の獲得と関連すると考えられた。また、2MT 刺激は皮膚や脳の虚血・再灌流傷害 モデルにおいて強力な治療効果を発揮することが明らかになった。一方、同じく低体温・低代謝 を誘導する冬眠状態とは対照的に、2MT 刺激は脳内のグルコース取り込みを促進し、血液中の 酸素飽和度を抑制した。全脳マッピングと薬理遺伝学による活性化実験により、2MT の感覚表現 が、脳幹 Sp5/NST から中脳 PBN 経路の活性化に変換されることで生理応答を誘導することが明ら かになった。 2MT やその他の tF0 刺激は、低体温、代謝低下、低酸素抵抗性を引き起こし、致死的な低酸素 状態での生存を可能にする。このような生理応答は、 <i>Trpa1</i> ノックアウトマウスでは著しく低下 した。TF0 による低体温の誘導には、 <i>Trpa1</i> を介した三叉神経／迷走神経経路と、 <i>Trpa1</i> を介さな い嗅覚経路が関与することが明らかになった。TF0 は、三叉神経節や迷走神経節から脊髄の三叉 神経核（Sp5）や孤路核（NTS）に投射する <i>Trpa1</i> 陽性の感覚経路を活性化し、また、それら感覚 神経を人工的に活性化することでも低体温が誘導された。TF0 の提示は NTS-PBN(parabrachial nucleus: 中脳結合傍腕核)を活性化して低体温と低代謝を引き起こすが、この神経経路の活性化 は <i>Trpa1</i> ノックアウトマウスで抑制された。重要なことに、TRPA1 の活性化だけでは、tF0 による 低酸素抵抗性の誘導には不十分で、Sp5/NTS の活性化も必要であることが明らかになった。この 原則に従うことで、既知の tF0 刺激と比較して、10 倍以上も長時間の致死的な低酸素状態に おける生存を可能にする超 tF0 刺激を発見した。適切な種類の tF0 と TRPA1 の組み合わせを選 択することで、生死を決する潜在的な保護作用を誘導できることが示された。2MT やその他の tF0 は、超正常先天的恐怖刺激として、マウスの潜在的な生命保護作用を誇張して誘発すると考えら れ、もし、このシステムがヒトに保存されていれば、「感覚創薬」という新しい分野を生み出す ために活用できると考えられる。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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. <u>Hayashi Y.</u> NMDA receptor-dependent dynamics of hippocampal place cell ensembles. <i>J Neurosci.</i> (査読あり) 39(26): 5173-5182, 2019 2. <u>Matsuo T.</u>, <u>Isosaka T.</u>, <u>Tang L.</u>, <u>Soga T.</u>, <u>Kobayakawa R.</u>, <u>Kobayakawa K.</u> Thiazoline-related TRPA1 agonist odorants orchestrate survival fate in mice. <i>bioRxiv</i> (査読なし) 10.1101/2020.05.17.100933, 2020 3. <u>Matsuo T.</u>, <u>Isosaka T.</u>, <u>Tang L.</u>, <u>Soga T.</u>, <u>Kobayakawa R.</u>, <u>Kobayakawa K.</u> Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related fear odors. <i>Commun Biol.</i> (査読あり) 4: 101, 2021 4. <u>Matsuo T.</u>, <u>Isosaka T.</u>, <u>Hayashi Y.</u>, <u>Tang L.</u>, <u>Doi A.</u>, <u>Yasuda A.</u>, <u>Hayashi M.</u>, <u>Lee CY.</u>, <u>Cao L.</u>, <u>Kutsuna N.</u>, <u>Matsunaga S.</u>, <u>Matsuda T.</u>, <u>Yao I.</u>, <u>Setou M.</u>, <u>Kanagawa D.</u>, <u>Higasa K.</u>, <u>Ikawa M.</u>, <u>Liu Q.</u>, <u>Kobayakawa R.</u>, <u>Kobayakawa K.</u> Thiazoline-related innate fear stimuli orchestrate hypothermia ad anti-hypoxia via sensory TRPA1 activation. <i>Nat Commun.</i> (査読あり) 12: 2074, 2021 5. <u>Hayashi Y.</u>, <u>Kobayakawa K.</u>, <u>Kobayakawa R.</u> Large-scale calcium imaging with a head-mount axial scanning 3D fluorescence microscope. <i>bioRxiv</i> (査読なし) 10.1101/2021.01.20.427512, 2021 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) 小早川 高「天敵の匂いと生体反応」 「Clinical neuroscience」32 巻 2 号 (中外医学社)、2021 年 1 月 31 日発行 <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>Kobayakawa R.</u> Cerebral and systemic integration mechanisms to elicit the crisis-response state. 第 42 回日本神経科学大会、新潟、2019 年 7 月 25 日～28 日 2. <u>Hayashi Y.</u> A head-mount 3D fluorescence microscope for mice. 第 42 回日本神経科学大会、新潟、2019 年 7 月 25 日～28 日 3. 小早川 令子「先天的と後天的な恐怖の統合メカニズムとその生物学的意義」、第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019 年 9 月 18 日～20 日 2. <u>Kobayakawa K.</u> Sensory TRPA1 activation by thiazoline-related odorants orchestrate life-protective effects. 生理学研究所 2019 年度国際研究集会「Pain and Survival Strategy」、岡崎、2020 年 1 月 7 日～8 日 3. <u>Kobayakawa K.</u> Innate fear odors elicit a physiological crisis mode that promotes survival in life-threatening situations. 第10回武田科学振興財団 薬科学シンポジウム、大阪、2020年1月24・25 日 4. 松尾 朋彦、伊早坂 智子、<u>小早川 令子</u>、<u>小早川 高</u>、「先天的恐怖を誘発する匂い物質による生体保護作用」、第 43 回日本神経科学大会、WEB開催、2020 年 7 月 29 日～8 月 1 日 5. 小早川 高、「Crisis fate orchestration：先天的恐怖情動誘導性の生命保護作用」、情動研究会 2020、WEB開催、2020 年 9 月 16 日 6. 小早川 令子、「人工冬眠・生命保護作用を誘導する匂い分子の発見とその作動機序」第 4 回 感覚研究フロンティアシンポジウム、WEB開催、2020 年 10 月 31 日 7. <u>Matsuo T.</u> Orchestrated induction of bioprotective effects by innate fear odors in mice 8th Symposium of the Smart-Aging Research Center, Tohoku University, 2020 Dec.10th <特許申請・取得状況> 1. 小早川 高、<u>小早川 令子</u>、「感覚刺激性向精神薬」、特願 2020-131872 (令和 2 年 8 月 3 日)			

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	海馬神経回路の光イメージング		
キーワード	神経回路、海馬、イメージング、シナプス		
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（研究総括、研究遂行担当） 金谷のり子（研究遂行、研究支援） 加藤梨絵（研究支援） 林美樹夫（研究遂行） 武藤恵（研究遂行）			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） 令和元(2019)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、今後さらに新たな「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」の探索を行った。 また遺伝子組換えウイルスを用いた新しい戦略技術の開発に取り組み、Cre リコンビナーゼと FLP リコンビナーゼがお互いに戦い合う「遺伝子の戦い」を用いた反発分離的遺伝子導入に関する新技術の発明に成功し、特許出願を行った（特願 2019-238481）。 令和 2（2020）年度 令和 2（2020）年度においては、「遺伝子の戦い」の概念の発表、およびその概念に基づき、Cre リコンビナーゼと FLP リコンビナーゼを用いた反発分離的遺伝子導入技術「BATTLE」の開発に成功した。さらにそれをマウス海馬において適用し、脳内で「遺伝子の戦い」を人工的に発生させることに成功した。また BATTLE の発展技術であり、まばら状態に複数色を用いて、神経細胞を可視化できる「BATTLE2」、3 色の蛍光蛋白質を用いた反発分離的遺伝子導入技術「BATTLE2. 1」の開発にも成功した。また、従来技術である膨張顕微鏡との複合技術である「BATTLE-1EX」の開発に成功し、従来技術では、これまで困難であったシナプスの全体像の光を用いた高精細の可視化を成功した。マウス海馬においては、DG-CA3 シナプスおよび、DG-mossy cell シナプスの全体像（プレシナプスおよびポストシナプスを含む）とシナプス構成タンパク質の局在について、高精細に可視化することに成功した。原理的には、すべての脳領域に適用できると考えられる。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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>Kohara K</u>, Inoue A, Nakano Y, Maruyama M, Baba R, Kawashima C.・BATTLE: Genetically Engineered Strategies for Split-Tunable Allocation of Multiple Transgenes in the Nervous System.・iScience・レフェリー有・23・101248・2020 ・Inoue A, Kobayashi T, Hirai H, <u>Kanaya N</u>, <u>Kohara K</u>.・Protocol for BATTLE-1EX: A High-Resolution Imaging Method to Visualize Whole Synaptic Structures and their Components in the Nervous System.・STAR Protocols・レフェリー有・1・100166・2020 ・Saha T, Aoun J, <u>Hayashi M</u>, Ali SI, Sarkar P, Bag PK, Leblanc N, Ameen N, Woodward OM, Hoque KM.・Intestinal TMEM16A control luminal chloride secretion in a NHERF1 dependent manner.・Biochemistry and biophysics reports・レフェリー有・25・100912・2021 ・Iwata R, Lee JH, <u>Hayashi M</u>, Diansani U, Ofune K, Maruyama M, Oe S, Ito T, Hashiba T, Yoshimura K, Nonaka M, Nakano Y, Norian L, Nakano I, Asai A.・ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma.・Neuro-Oncology・レフェリー有・22(3)・333 - 344・2020 ・Shoji T, <u>Hayashi M</u>, Sumi C, Kusunoki M, Uba T, Matsuo Y, Kimura H, Hirota K.・Pharmacological polysulfide suppresses glucose-stimulated insulin secretion in an ATP-sensitive potassium channel-dependent manner.・Scientific Reports・レフェリー有・9・19377・2019 ・Kusunoki M, <u>Hayashi M</u>, Shoji T, Uba T, Tanaka H, Sumi C, Matsuo Y, Hirota K.・Propofol inhibits stomatocytin-1-sensitive voltage-dependent K⁺ channels in pancreatic β-cells and enhances insulin secretion.・PeerJ・レフェリー有・7・e8157・2019 ・<u>Hayashi M</u>.・Expression of adenosine receptors in rodent pancreas.・International Journal of Molecular Sciences・レフェリー有・20(21)・E5329・2019 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) ・<u>小原圭吾</u>・脳科学辞典・「神経栄養因子」・2020・DOI : 10.14931/bsd.9363 ・林美樹夫, 岩田亮一, 羽柴哲夫, 埜中正博, 浅井昭雄・近畿脳腫瘍病理検討会・Neuro-Oncologyの進歩 27(1) グリオーマにおける一過性受容体電位型チャネルの分子基盤・2020年・12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) ・<u>Kohara K</u>, Inoue A, Nakano Y, Hirai H, Kobayashi T, Maruyama M, Unzai T, Baba R, Kawashima C.・Battle of recombinases and novel genetically engineered strategies for split-tunable expression of multiple transgenes in the nervous system.・The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society・Web・2020年7月 ・Hoque KM, Saha T, Aoun J, <u>Hayashi M</u>, Sheikh IA, Leblanc N, Sarkar P, Ameen N, Woodward OM.・Intestinal TMEM16A function as a luminal chloride channel.・The FASEB Journal 2020; 34: s1.06115 (抄録) ・<u>林美樹夫</u>・ムコリピンを標的としたがん予防薬の開発・革新的医療技術創出拠点 令和二年度成果報告会 ―5年間のあゆみ、そしてその先へ―・Web・2021年3月 ・<u>林美樹夫</u>・ムコリピンを標的としたがん予防薬の開発・第8回 TR 推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会・Web・2021年2月			

・岩田亮一, 林美樹夫, 埜中正博, 浅井昭雄・GBM に対する ICOSLG を標的とした新規治療法の開発・第 30 回日本サイトメトリー学会学術集会・日本・2020 年 5 月

・Hoque KM, Saha T, Aoun J, Hayashi M, Sheikh IA, Leblanc N, Sarkar P, Ameen N, Woodward OM.・Intestinal TMEM16A function as a luminal chloride channel.・Experimental Biology 2020・2020 年 4 月 (アメリカ、サンディエゴ)

・Hayashi M.・Involvement of A2A and A2B adenosine receptors in physiological and pathophysiological functions in pancreas.・第 97 回日本生理学会大会・日本・2020 年 3 月

・林美樹夫・ムコリピンを標的としたがん予防薬の開発・第 10 回スクリーニング学研究会・日本 2019 年 11 月

・Taketo M. Function of metabotropic glutamate receptor 1 in the neonatal hippocampal marginal zone. The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan・日本・2020/03

<特許申請・取得状況>

・小原圭吾、特許出願：新戦略を用いた遺伝子導入技術の発明 (特願 2019-238481)

・窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー
林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一
特許、JP2021/55869

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）：分担研究者として課題全般に取り組む。 中村正孝（講師）：分担研究者として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（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） 定位脳手術にてラットの一側内東前脳束に 6-OHDA を局所投与し、一側性パーキンソン病モデルラットを作成した。 2 週間のレボドパ間欠投与、持続投与もしくは無治療ののち、レボドパ誘発性ジスキネジアを評価した。さらにラットの左右の線条体においてセロトニン受容体およびセロトニントランスポーター遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR で定量し、健側に対する術側での発現量の変化を検討した。 無治療およびレボドパ持続投与群ではレボドパ誘発性ジスキネジアはみられなかったが、レボドパ間欠投与群では強いジスキネジアがみられた。無治療の一側パーキンソン病モデルラットでは健側に対して術側線条体でセロトニントランスポーターやセロトニン 1A、1B 受容体の mRNA の発現量が増加していた。2 週間のレボドパ持続投与群ではいずれの遺伝子発現量も術側と健側で差がみられなくなっていた。2 週間のレボドパ間欠投与群ではセロトニン 1B 受容体 mRNA の発現量は術側で増加したままであったが、セロトニントランスポーターおよびセロトニン 1A 受容体 mRNA の発現量は術側と健側で差がみられなくなった。 セロトニン 1A、1B 受容体発現量の変化がレボドパ誘発性ジスキネジア発症の背景にあると考えられた。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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) すべて査読有 1: <u>Nakamura M</u>, <u>Kaneko S</u>, Dickson DW, <u>Kusaka H</u>. Aberrant Accumulation of BRCA1 in Alzheimer Disease and Other Tauopathies. J Neuropathol Exp Neurol. 2020 Jan 1;79(1):22-33. doi: 10.1093/jnen/nlz107. PMID: 31750914. 2: Nakayama K, <u>Nakamura M</u>, Konishi A, <u>Kaneko S</u>, Nakamichi K, Saijo M, Yakushiji Y, <u>Kusaka H</u>. JC virus granule cell neuronopathy associated with Ruxolitinib: A case report and review of the literature. eNeurologicalSci. 2020 Sep 2;21:100269. doi: 10.1016/j.ensci.2020.100269. PMID: 32954021; PMCID: PMC7486434. <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>Tohge R</u>, <u>Kaneko S</u>, <u>Morise S</u>, <u>Oki M</u>, Takenouchi N, <u>Nakamura M</u>, <u>Kusaka H</u>. Compensatory up-regulation of serotonin transporter in a rat model of Parkinson's disease 第13回パーキンソン病運動障害疾患コンgres 東京 2019年7月 <u>Tohge R</u>, <u>Kaneko S</u>, <u>Morise S</u>, <u>Oki M</u>, <u>Nakamura M</u>, Takenouchi N, <u>Kusaka H</u>. Co-administration of levodopa and zonisamide reduces the serotonin transporter expression in a rat model of Parkinson's disease. MDS International Congress Nice, France 2019-09 <u>Kaneko S</u>, <u>Morise S</u>, <u>Tohge R</u>, <u>Oki M</u>, <u>Nakamura M</u>, Takenouchi N, <u>Kusaka H</u>. Zonisamide ameliorates levodopa-induced dyskinesia via striatal cholinergic system in a rat model of Parkinson's disease MDS International Congress Nice, France 2019-09 <u>Tohge R</u>, <u>Kaneko S</u>, <u>Morise S</u>, <u>Oki M</u>, <u>Nakamura M</u>, Takenouchi N, <u>Kusaka H</u>. Changes of striatal serotonin transporter expressions in a rat model of levodopa-induced dyskinesia 第61回日本神経学会学術大会 岡山 2020年8月 <特許申請・取得状況> なし			

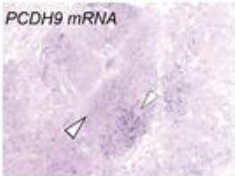
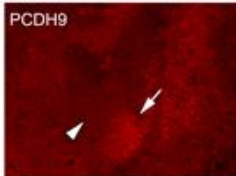
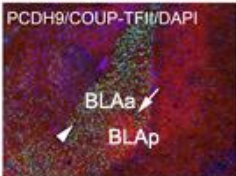
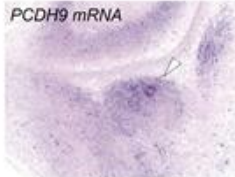
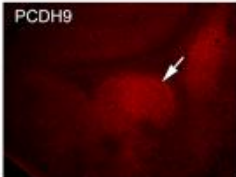
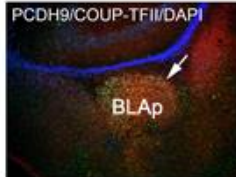
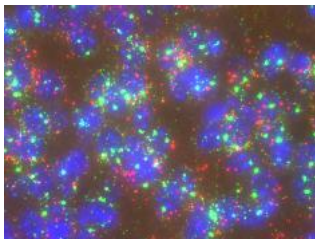
研究成果報告書の概要

講座等名	皮膚科学講座	事業推進者名	谷崎 英昭
所属部門	神経部門		
分担研究課題	炎症性皮膚疾患において皮膚に浸潤する好塩基球の解析 痒み誘発刺激における表皮内神経 in vivo イメージングとかゆみ伝達機構の解明		
キーワード	アトピー性皮膚炎、即時型アレルギー、in vivo イメージング、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） 谷崎 英昭（教授）：研究の統括 山崎 文和（准教授）：検体の収集と研究の指導 神戸 直智（非常勤講師）：研究の立案 岸本 泉（助教）：好塩基球と炎症シグナル経路の疾患に関わる解析 松田 智子（助教）：肉芽腫性疾患に関わる炎症細胞解析 植木 瑤子（大学院生）：アトピー性皮膚炎マウスモデルの実験系 Ma ni（大学院生）：好塩基球と炎症シグナル経路の疾患に関わる解析			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） 1) 乾癬に病変局所における単球サブセット解析 乾癬の病変部において Th17 環境を中心とした炎症の遷延が生じている。病変部皮膚では、CD14 と CD16 を共発現する TNF α 陽性細胞が多く浸潤し、乾癬の病態初期に関わることが示唆された。また、末梢血中の単球においては、乾癬の病勢を評価する指標である PASI スコアと CD14 と CD16 を共発現する比率の上昇を認め、CD86 の発現が病勢を反映する可能性も示唆された。今回、単球に着目することによって従来 T リンパ球が中心とかがえられていた病態形成期の炎症反応において、ある種の単球、さらには B 細胞も関与していることが示唆された。 2) Blau 症候群患者由来の iPS 細胞を用いた炎症性サイトカイン産生能の解析 Blau 症候群は、皮膚、関節、眼に肉芽腫を生じる難病の一つで、NOD2 という炎症・免疫反応に関わる遺伝子に異常があることが分かっている。今回、Blau 症候群の患者由来の iPS 細胞を作成し、ゲノム編集技術（CRISPR-Cas9 システム）を用いて遺伝子変異を修復した正常な iPS 細胞、健常者由来の iPS 細胞に、同じゲノム編集技術を用いて、今度は NOD2 遺伝子変異の挿入を行った。これらの iPS 細胞に対して NOD2 のリガンドとして知られる Muramyl dipeptide (MDP) と IFN- γ を添加して炎症反応を惹起し、炎症性サイトカイン産生能を解析した。その結果、機能獲得型変異と考えられる R334W 変異をもった細胞が NOD2 のリガンドである MDP に対して低反応性を示す現象が観察されて、NOD2 の下流において NF- κ B のネガティブフィードバックと呼ぶべき機構を介してシグナル調整をしていることが示唆された。今後はこの機構を詳細に検討することで、好中球性の急性期炎症から肉芽腫といった遅発性の免疫応答に移行する機序の解明に貢献できると期待される。 3) 慢性蕁麻疹における好塩基球の振る舞い 即時型アレルギー反応の代表疾患ともいえる蕁麻疹においては、受診時に膨疹が消退しているなど、病勢の評価などが困難であった。今回、末梢血好塩基球に発現する CD203c を指標とした検査方法を樹立した。疾患コントロール不良の難治性慢性蕁麻疹患者に対して抗 IgE 抗体の投与前後で末梢血を評価したところ、病勢の強い（症状悪化）時期には、好塩基球は血中に比して優位に皮膚における浸潤が増えており、治療後は末梢血中の比率が戻ることが判明した。これらは、蕁麻疹において好塩基球が病態遷延に関与していることを示唆しており、組織移行のタイミングを見計らって採血など行うことによって、臨床病勢の反映をとらえる事が出来る可能性を見いだすことが出来た。			

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	谷崎 英昭
記載要領 <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>Matsuda T</u>, <u>Yamazaki F</u>, Ueda-Hayakawa I, <u>Kambe N</u>, Okamoto H. Case of pityriasis rubra pilaris progressed to generalized erythroderma following blockade of interleukin-17A, but improved after blockade of interleukin-12/23 p40. J Dermatol. 46:70-72, 2019. 査読あり 2. <u>Kishimoto I</u>, Nguyen CTH, <u>Kambe N</u>, Ly NTM, <u>Ueki Y</u>, Ueda-Hayakawa I, Okamoto H. Circulating intermediate monocytes produce TARC in sarcoidosis. Allergol Int. 69: 310-312, 2020. 査読あり 3. <u>Kishimoto I</u>, <u>Kambe N</u>, Ly NTM, Nguyen CTH, Okamoto H. Basophil count is a sensitive marker for clinical progression in a chronic spontaneous urticaria patient treated with omalizumab. Allergol Int. 68: 388-390, 2019. 査読あり 4. <u>Matsuda T</u>, <u>Kambe N</u>, <u>Ueki Y</u>, Kanazawa N, Izawa K, Honda Y, Kawakami A, Takei S, Tonomura K, Inoue M, Kobayashi H, Okafuji I, Sakurai Y, Kato N, Maruyama Y, Inoue Y, Otsubo Y, Makino T, Okada S, Kobayashi I, Yashiro M, Ito S, Fujii H, Kondo Y, Okamoto N, Ito S, Iwata N, Kaneko U, Doi M, Hosokawa J, Ohara O, Saito MK, Nishikomori R; PIDJ members in the JSIAD; PIDJ (Primary Immunodeficiency and Autoinflammatory Diseases Database Project) members in the JSIAD (Japanese Society for Immunodeficiency and Autoinflammatory Diseases). Clinical characteristics and treatment of 50 cases of Blau syndrome in Japan confirmed by genetic analysis of the NOD2 mutation. Ann Rheum Dis. 79:1492-1499, 2020. 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>岸本泉</u> 病変局所へ浸潤する好塩基球に注目した特発性蕁麻疹の病態検討 第2回日本アレルギー学会地方会近畿支部学術講演会 京都 2019年10月 2. <u>谷崎英昭</u> 蕁麻疹診療ガイドライン2018に基づく蕁麻疹治療の実践 第36回日本臨床皮膚科医会総会 浜松 2020年9月 3. <u>谷崎英昭</u> ブラウ症候群患者由来 iPS 細胞から分化誘導した 単球細胞株における炎症シグナル経路の検討 第四回学術祭 大阪 2020年11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	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	カドヘリン、プロトカドヘリン		
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）			
平野 伸二（教授）マウスの行動解析、全般の統括 上村 允人（助教）ノックアウトマウスの組織解析 岡野 圭子（講師）プロトカドヘリンの分子解析、ノックアウトマウスの組織解析 鈴木 信太郎（非常勤講師）プロトカドヘリンとカドヘリンによる接着機構の解析 中藤 美織（臨時職員）実験補助			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）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についてノックアウトマウスを用いて解明することを目的としている。			
1）自閉症関連遺伝子プロトカドヘリン9のノックアウトマウスの解析			
まず、プロトカドヘリン9の扁桃体での発現分布をより詳細検討した。まず、in situ ハイブリダイゼーションによって mRNA の発現を、免疫組織化学法によりタンパク質の分布を見たところ、プロトカドヘリン9は BLA 後部に多く発現・分布していることが明らかになった（図1）。さらに、プロトカドヘリン9を発現する細胞の同定を試みた。恐怖情動を OFF にする細胞のマーカーである Ppp1rb とプロトカドヘリン9について二重 in situ ハイブリダイゼーションを行った結果、プロトカドヘリン9は Ppp1rb 陽性細胞で発現が見られることがわかった（図2）。以上の結果から、扁桃体後部ではプロトカドヘリン9 陽性細胞が、快不快情動に関与している可能性が考えられた。			
PCDH9 mRNA  PCDH9  PCDH9/COUP-TFII/DAPI  PCDH9 mRNA  PCDH9  PCDH9/COUP-TFII/DAPI 			
図1 扁桃体におけるプロトカドヘリン9 (PCDH9)の発現と分布			
			
図2 BLA 後部におけるプロトカドヘリン9（緑）と Ppp1rb（赤）の発現			

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） Panezai SK, Luo Y, Vibulyaseck S, Sarpong GA, Nguyen-Minh VT, Nedelescu H, <u>Hirano S</u>, Sugihara I. Reorganization of longitudinal compartments in the laterally protruding parafoveolus of the postnatal mouse cerebellum. <i>J Comp Neurol.</i>（レフェリー有） 528(10), 1725-1741, 2020 <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>上村 允人</u>、古瀬 民生、山田 郁子、岡野 圭子、田村 勝、<u>平野 伸二</u>、情動系神経回路における自閉症関連遺伝子 <i>Pcdh9</i> の機能、日本分子生物学会、福岡、2019 年 12 月 <特許申請・取得状況> 該当なし			

次に、海馬におけるプロトカドヘリン9の役割を調べるために、交配により Thy-1GFP を発現するプロトカドヘリン9ノックアウトマウスを作成した。Thy-1 GFP は、海馬の錐体ニューロンで発現しているため、ノックアウトマウスでそのスパインの形成を調べた。その結果ノックアウトマウスでは、スパインの数が減少していることが明らかになった。これについては、従来法のゴルジ染色によっても確認された。また、これまでにノックアウトマウスの脳室が大きくなっていることを見出したが、今期にその定量化を行った。

一方、これまでにノックアウトマウスの行動解析を理化学研究所の古瀬民生博士らと共同研究を行い、新奇物体を避けるという情動行動の亢進が見られていたが、今回それが恐怖によるものかどうかを、ビー玉隠しテストを行い検討した。その結果、オープンフィールドテストではノックアウトマウスの中心の滞在時間が少ないなどの情動が高まっている傾向が確認されたが、ビー玉隠しテストでは有意な差はみられなかったため、従って、ノックアウトマウスの新奇物体の忌避は、恐怖によるものではなく、不快情動の亢進の可能性が考えられた。

2) 古典的カドヘリンの接着機構

古典的カドヘリンの接着機構を解明するために、カドヘリンとその結合分子である α カテニンの欠損細胞を作成し、その表現型を解析した。特定の細胞外基質中では、それらの欠損細胞の接着は異常になっていることがわかった。

2. がん部門

実験病理学講座	
微生物学講座	
分子遺伝学部門	
モデル動物部門	
内科学第一講座	
内科学第三講座	
外科学講座	
腎泌尿器外科学講座	
臨床病理学講座	

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 松浦 徹 オルガノイド培養 藤田恭平 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（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について）			
(1)タイムラプスイメージング法を用いた発生期膵臓の細胞系譜追跡実験 Sox9-CreERT2; Rosa26-rainbow マウスを用いて、Sox9⁺膵前駆細胞の多色細胞系譜追跡実験を実施した。当該マウスでは、タモキシフェン誘導的に Cre-loxP システムが働き、緑色蛍光を呈していた Sox9⁺細胞が、青・橙・赤色のいずれかの蛍光色に特異的に標識される。胎生 12.5 日目（E12.5）のマウス膵臓原基の <i>ex vivo</i> 培養細胞を用いて Sox9⁺膵前駆細胞を標識した後、E14.5 から E18.5 までの 4 日間の長期 3 次元タイムラプスイメージングを実施した。これにより、Sox9⁺膵前駆細胞の細胞系譜（増殖・分裂・移動・分化・集合といった生命現象）をリアルタイムで長時間撮影し、追跡することに成功した。 (2)免疫組織染色による膵内分泌細胞への分化確認実験 タイムラプスイメージング終了後、Sox9⁺膵前駆細胞の膵島への寄与を確認するため、各種抗体を用いて免疫組織染色を施した後、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。その結果、E18.5（day 6）膵臓 <i>ex vivo</i> 培養細胞において、グルカゴン⁺α細胞、インスリン⁺β細胞およびソマトスタチン⁺δ細胞の少なくとも 3 種類の内分泌細胞の存在が認められ、良好な内分泌細胞分化が確認できた。膵臓原基の <i>ex vivo</i> 培養細胞では、成体組織に比べ膵島形成が未発達であることから、これらの内分泌細胞が集合した小型の膵島が認められた他、分散ないし集合過程の細胞塊が認められた。さらに、膵島が青・赤・橙色の多色で構成され、それらがグルカゴン⁺α細胞ないしインスリン⁺β細胞であることを確認した。また、同一膵島内に異なる色のβ細胞が認められたことから、複数の Sox9⁺膵前駆細胞が移動および分化し、膵島形成に寄与したことが示唆された。一方、ソマトスタチン⁺δ細胞に関しては、内分泌細胞分化において後期に出現する細胞であることと相関して、α細胞およびβ細胞と比較して、非常に細胞数が少ない傾向が認められた。 今後、タイムラプスイメージングによって得られた画像データと免疫組織染色の結果を照合し、Sox9⁺膵前駆細胞の詳細な動態解析を行うことで、原始膵管から個々の細胞がどのように増殖・移動・分化して膵島が形成されるのか解明するための有用な手掛かりが得られるものとする。			

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. <u>Hisha H, Ueno H</u>. Organoid Culture of Lingual Epithelial Cells in a Three-Dimensional Matrix. Methods Mol Biol・レフェリー有・1576・2019 2. Okada T, Minato N, Kanemoto SY, Zempo N, <u>Saiga K, Namikawa K, Kanno S, Ueno H</u>. Intimal regeneration after coronary endarterectomy and onlay grafting in coronary artery bypass grafting. Gen Thorac Cardiovasc Surg・レフェリー有・67(8)・2019 <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>Ueno H</u>. Identification of adult stem cells in the para-oral cavity region. Joint Annual Meeting of 71st JSCB & 19th PSSJ・2019年6月 2. <u>上野博夫</u> 味蕾幹細胞の同定と解析 第53回大会 日本味と匂学会・2019年9月 3. <u>上野博夫</u> Identification of adult stem cells by the multicolor lineage tracing and the sc RNAseq methods. 第78回日本癌学会学術総会・2019年9月 4. <u>上野博夫</u> 多色細胞系譜追跡法と single cell RNAseq を基点とした成体幹細胞の同定・第五回公開シンポジウム「多面的 1 細胞解析技術が解き明かす細胞社会ダイバーシティー」・2020年1月 5. <u>上野博夫</u> 組織発生と器官創生：基礎研究による病態の理解と臨床応用・第109回日本病理学会総会・2020年4月 6. 田中慧介, 田中準一, 相澤 怜, 吉田真子, 松浦 徹, 藤田恭平, 田中麻友, <u>上野博夫</u>, 美島健二, 山本松男 多色細胞系譜追跡法を用いた歯肉接合上皮細胞のクローナリティ解析・2020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	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, NOG-SCID, ヒト化マウス		
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） 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)：ウイルス遺伝子の機能解析 大高時文(助教)：抗 Tax ワクチンの解析 中嶋伸介(助教)：免疫細胞の解析			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） HTLV-1 感染が原因で発症する悪性の白血病 ATL において、免疫チェックポイント分子 PD-L1 の過剰発現による抗腫瘍免疫からの回避が報告されていることから、NOG-SCID マウスのヒト臍帯血由来造血幹細胞移植で作製したヒト化マウスに HTLV-1 を感染させることで ATL 様病態が再現された HTLV-1 感染ヒト化マウスモデルへの、抗 PD-1 抗体の投与効果を検討した。 その結果、ヒト化マウスに HTLV-1 を感染させると、数週間で CD45(+) ヒト血球細胞数が感染前の数倍～数百倍に増加し、8 週以内に全頭死亡したのに対し、感染 2.5 週に抗 PD-1 抗体を腹腔内投与したところ、感染細胞の腫瘍性増殖は 10 倍以下に抑制され、全頭、2 ヶ月以上生存したことから、免疫チェックポイントシグナルの抑制を介した抗 HTLV-1 免疫の上昇が示唆された。 そこで、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける感染リンパ球を解析したところ、本来の標的細胞である CD4(+)T 細胞だけではなく、CD8(+)T 細胞の異常増殖も観察されたことから、HTLV-1 の感染を解析したところ、増加した CD8(+)T 細胞の大部分が HTLV-1 に感染していることが明らかとなり、HTLV-1 感染による抗原非特異的なポリクローナル増殖が、宿主免疫系全体に PD-1/PD-L1 をはじめとする免疫チェックポイントシグナルを誘導することで、HTLV-1 特異的な細胞障害性 T 細胞の活性が減弱した可能性が考えられた。 また、近年、腸内細菌叢が宿主免疫に影響することで、発癌に関与する可能性が示唆されていることから、HTLV-1 感染ヒト化マウス糞便中の、細菌由来 16S rRNA の塩基配列を MinION シーケンスの手法で決定し、経時的に解析したところ、非感染マウスでは 20%～50%を占めていた乳酸桿菌属の細菌が、感染の進行にともない 1%～2%にまで減少することが明らかとなった。さらに、この乳酸桿菌属の減少は、感染リンパ球の急速な増殖以前に観察されたことから、乳酸桿菌属が感染細胞の腫瘍性増殖に抑制的に働いていた可能性が示唆された。 そこで、ヒト化マウスに、抗菌薬の給水投与で腸内細菌を除去した後、HTLV-1 を感染させ、感染率および ATL 様病態の発症率を非投与群と比較したところ、発症率に関しては腸内細菌の有無は影響しなかったが、無菌化したヒト化マウスでは、通常の SPF ヒト化マウスと比較して、少ない感染リンパ球数で死亡することが明らかとなり、無菌ヒト化マウスにおいては、HTLV-1 感染に対する過剰な宿主免疫応答を介した個体死が示唆された。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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. J. Yao, M. Tanaka, <u>N. Takenouchi</u>, Y. Ren, S.-I. Lee, <u>J.-I. Fujisawa</u>. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase in HTLV-1-infected humanized mice. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase in HTLV-1-infected humanized mice. Exp Ther Med, レフェリー有り, 17, 3701-3708, 2019. 2. H. Katsuya, S. Islam, B. J. Y. Tan, J. Ito, P. Miyazato, M. Matsuo, Y. Inada, S. C. Iwase, Y. Uchiyama, H. Hata, T. Sato, N. Yagishita, N. Araya, <u>T. Ueno</u>, K. Nosaka, M. Tokunaga, M. Yamagishi, T. Watanabe, K. Uchimar, <u>J.-I. Fujisawa</u>, A. Utsunomiya, Y. Yamano, and Y. Satou . The Nature of the HTLV-1 Provirus in Naturally Infected Individuals Analyzed by the Viral DNA-Capture-Seq Approach. Cell Reports, レフェリー有り, 29, 724-735, 2019. <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. Ueno</u>, A. Joseph, T. Matsunaga, <u>T. Otake</u>, Y. Ren, J. Yao, S.-I. Lee, A. Ryo, <u>J.-I. Fujisawa</u>. Anti-PD-1 antibody suppressed the leukemic growth of HTLV-1 infected cells in humanized mouse model. 19th International Conference on Human Retrovirology, Lima, Peru, 2019.4.24. 2. M. Matsuo, <u>T. Ueno</u>, P. Miyazato, H. Katsuya, S. Islam, B.J. Tan, S. Iwase, M. Tokunaga, K. Nosaka, A. Utsunomya, <u>J. Fujisawa</u>, Y. Satou. Identification and Molecular Characterization of a New HTLV-1 Enhancer. 19th International Conference on Human Retrovirology, Lima, Peru , 2019.4.24. 3. 大高時文、中嶋伸介、李 成一、<u>上野孝治</u>、任 翊華、姚 錦春、<u>藤澤順一</u>. HTLV-1 感染ヒト化マウスリンパ球における Tax および HBZ mRNAの発現、第6回日本HTLV-1学会学術集会、ニューウェルシティ宮崎 (宮崎)、2019.8.24. 4. 中嶋伸介、<u>大高時文</u>、李 成一、<u>藤澤順一</u>. HTLV-1感染ヒト化マウスにおける感染細胞の表現型解析、第6回日本HTLV-1学会学術集会、ニューウェルシティ宮崎 (宮崎) 2019.8.24. 5. 松尾美沙希, <u>上野孝治</u>, 宮里パオラ, 勝屋弘雄, タン ベンジー, ジャック ヤン, イスラム サイフル, 徳永雅仁, 野坂生郷, 宇都宮與, <u>藤澤順一</u>, 佐藤賢文. HTLV-1ウィルスエンハンサーはウィルス遺伝子および宿主遺伝子発現の亢進を誘導する、第6回日本HTLV-1学会学術集会、ニューウェルシティ宮崎 (宮崎)、2019.8.24. <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	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） 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） 福原貴太郎・研究員（リンパ球動態） 堀谷俊介・研究員（リンパ球動態）2020 年 9 月～			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）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。Rap1 欠損 T 細胞における動態異常の原因を突き止めるためにケモカイン刺激時の細胞極性の効率をイメージストリームによる F-actin と CD44 の染色像を多量に撮影して解析ところ、野生型に比べ、細胞極性の効率が顕著に低下することが明らかとなった。さらにケモカインに対するケモタキシスを測定したところ、低下していた。以上のことから、Rap1 はインテグリン依存的な接着のみならず、細胞極性の形成を促進することにより T 細胞の動態を制御していることが明らかとなった。Rap1 による細胞極性の制御機構を明らかにするために、細胞極性の制御分子である Rho family GTPase の活性を測定したところ、RhoA の活性化が低下していることが明らかになりつつあり、Rap1 が RhoA を介して細胞極性を促進している可能性が示唆される。 リンパ節へのホーミングにおいて、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 割程度、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これまでに判明した。その理由を調べるため、in vitro の Flow assay 系および ¹²⁵I を用いたラジオアイソトープ実験で HEV での接着分子リガンドの種類やその濃度を推定した。T 細胞動態を制御する Rap1 シグナルをより詳細に解析するため、Rap1 の上流に位置する活性化因子 GEF（グアニンヌクレオチド交換因子）の C3G、RasGRP2 それぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスの解析し、C3G、RasGRP2 がそれぞれ機能する時空間的な違いを Flow assay 系で調べた。また、Rap1 の不活性化因子にも注目し、RASA3、SIPA1 それぞれの KO マウスおよびダブル KO マウスの解析を進めた。RASA3、SIPA1 のダブル KO T 細胞においては、ケモカイン刺激なしで接着分子リガンドに結合できるほどに Rap1 が活性化することがわかった。 リンパ節内での抗原認識に伴う細胞間接着の詳細な分子制御機構を解明する目的で、LFA-1 を発現するリンパ球に、光安定性の高い蛍光物質と細胞内で共有結合する HaloTag と Talin1/Kindlin-3 を融合させたタンパク質を排他的に発現させ、全反射顕微鏡を用いてビデオレート撮像することにより Talin1 と Kindlin-3 の細胞内一分子動態を世界に先駆けて可視化することに成功した。Talin1 と Kindlin-3 は LFA-1 に対して異なる結合速度を示し、どちらも LFA-1-ICAM-1 相互作用に誘起される強い Rap1 の活性化を伴う outside-in シグナル依存的に LFA-1 との結合が大きく促進			

されることが明らかになった。

インテグリン活性化とそのシグナル伝達機序の詳細を調べるためにインテグリンを阻害する薬剤の探索を行なった。T インテグリン及びその複合体の構造情報に対して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。それらの薬効について *in vitro* 試験を行ったところ、インテグリンの活性化を阻害する薬剤の同定に至った。今後は、本薬剤によるインテグリン阻害によって細胞シグナルがどのように変化するかにについて解析する。

優れた成果があがった点

1. Rap1 シグナルによる胸腺細胞や T 細胞の細胞動態の調節のメカニズムがライブイメージングや定量的かつ大規模な細胞極性解析により明らかとなった。
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 HEV へのホーミングの違いをさらに解析し、接着分子リガンドの種類やその濃度を推定した。
3. Talin 1 と Kindlin-3 の生きたリンパ球内での分子動態が初めて明らかになり、LFA-1 を介した免疫細胞間接着のコアとなる制御原理の一端が解明された。
4. インテグリンの機能を阻害する新規薬剤を取得した。

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) (2020 年度) 1. Kawai K., Tomonou M., Machida Y., Karuo Y., Tarui A. Sato K., <u>Ikeda Y.</u>, <u>Kinashi T.</u>, Omote M., Effect of Learning Dataset for Identification of Active Molecules: A Case Study of Integrin αIIbβ3 Inhibitors. <i>Mol Inform.</i> 2021 Mar 18. doi: 10.1002/minf.202060040. Online ahead of print. (査読有) 2. Suzuki K., Iwai H., Utsunomiya K., Kono Y., Kobayashi Y., Bui DV., Sawada S., Yun Y., Mitani A., <u>Kondo N.</u>, Katano T., Tanigawa N., Takama T., Kanda A., Combination therapy with lenvatinib and radiation significantly inhibits thyroid cancer growth by uptake of tyrosine kinase inhibitor, <i>Exp Cell Res.</i> 2021 Jan 1;398(1):112390. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112390. Epub 2020 Nov 21. (査読有) 3. 池田幸樹、<u>木梨達雄</u> インテグリン創薬から考える一回膜貫通型タンパク質における創薬ストラテジー SAR News 39:17-23 2020/10 総説 4. <u>Ueda Y.</u>, <u>Kondo N.</u>, <u>Kinashi T.</u> MST1/2 Balance Immune Activation and Tolerance by Orchestrating Adhesion, Transcription, and Organelle Dynamics in Lymphocytes <i>Frontiers in immunology</i> 11:733 2020/05 総説 5. <u>木梨達雄</u>【ジーンハンティングによる炎症・免疫研究の発展】IL-4 および IL-5 の遺伝子クローニング 炎症と免疫 26(3)175-180 2020/04 総説 (2019 年度) 1. <u>木梨達雄</u> 白血球インテグリンによる接着の制御機構 日本血栓止血学会誌 2019, 30(4):586-595 総説 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) (2019 年度・2020 年度)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) (2020 年度) 1. K. Baba, Y. Nagashima, R. Takeuchi, M. Sakai, Y. Higashiguchi, H. Katsuno-Kambe, <u>Y. Ueda</u>, <u>Y. Kamioka</u>, <u>T. Kinashi</u>, N. Inagaki, Shootin1b as a clutch molecule for dendritic cell chemotaxis, CELL BIO virtual 2020(Web Meeting), December 14, 20 2. 近藤直幸、植田祥啓、<u>木梨達雄</u> Rap1/Talin-1/Kindlin-3 を内包する新規ポジティブフィードバック回路によるインテグリン活性化の離散的制御 第 43 回日本分子生物学会年会、2P-0195、オンライン学会 (2019 年度) 1. <u>木梨達雄</u> 白血球インテグリン接着のメカニズムと炎症性腸疾患への応用 第 56 回日本消化器免疫学会総会 2019/8/2 Kyoto 招待講演 2. <u>Yoshiki Ikeda</u>, Naoyuki Kondo, Hiroyuki Takeda, Yoshimasa Makita, Yoshifumi Fukunishi, <u>Yoshihiro Ueda</u>, Kazuyuki Sato, Masanori Murayama, Biao Ma, Yuta Isaka, Kentaro Kawai, Tadaaki Mashimo, <u>Yuji Kamioka</u>, Mitsugu Araki, Masaaki Omote and <u>Tatsuo Kinashi</u>, インテグリン関連疾患治療薬開発に向けた薬剤スクリーニング法の開発, 第 10 回スクリーニング学研究会 11/21-11/22, Tokyo, (ポスター発表) 3. <u>Yoshiki Ikeda</u>, アカデミア創薬・インテグリン創薬コンソーシアム事業から学ぶアカデミア創薬研究の流れ, 第 10 回スクリーニング学研究会プレカンファレンス 11/21-22, Tokyo, (口頭発表) 4. <u>Y Kamioka</u>, <u>Y Ueda</u>, <u>N Kondo</u>, <u>T Kinashi</u>, Roles of Rap1 signaling in lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes, The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2019. (第 48 回 日本免疫学会学術集会 2019) 2019/12/12 Hamamatsu 5. <u>Y Ueda</u>, K Higasa, <u>Y Kamioka</u>, <u>N Kondo</u>, <u>T kinashi</u>, Rap1 accelerates T cell polarity formation via the enhancement of Rho-Rock pathways, The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2019. (第 48 回 日本免疫学会学術集会 2019) 2019/12/12 Hamamatsu			

＜特許申請・取得状況＞

(2019 年度・2020 年度)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	遺伝子改変マウスを用いた疾患発症機構の解明		
キーワード	遺伝子改変マウス、疾患モデル		
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）実験動物飼育共同施設の運用・管理 村山正承（講師）遺伝子改変マウス・疾患モデルマウスを用いた生理機能解析			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） 生命現象の理解や疾患発症機構の解明・治療法治療薬開発のために遺伝子改変マウス・疾患モデルマウスが用いられている。免疫疾患は常在細菌叢に大きく影響することが知られる。そのため疾患モデルを導入する際には、実験動物施設に適した実験条件を検討する必要がある。本研究では多発性硬化症の疾患モデルマウスである実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE）、関節リウマチの疾患モデルマウスであるコラーゲン誘導関節炎（collagen-induced arthritis: CIA）、尋常性乾癬の疾患モデルマウスであるイミキモド誘導乾癬（imiquimod-induced psoriasis: IMQ）の導入を試みた。購入したマウスは実験動物施設に馴化させるため、1 ヶ月程度維持した後に疾患モデルを誘導した。 条件検討の結果、EAE はにて中程度の重症度を 100%の発症率にて発症した（15/15 匹）。CIA は高感受性の DBA/1 マウスが 100%（9/9 匹）、抵抗性の C57BL/6 マウスが 90%（8/9 匹）の発症率にて中程度の関節炎を発症した。IMQ は炎症を誘導した耳の肥厚が 150-200%程度となる重症度の条件を確立することが出来た。これら確立した疾患モデルを活用して学内外の研究機関と共同研究を実施している。また、炎症性サイトカインである IL-17 の挙動をモニターできる IL-17 EGFP KI マウスをはじめとするいくつかの遺伝子改変マウスを導入しており、免疫疾患発症機構の解明を進めている。 本研究成果は科学研究費助成事業基盤研究（B）21H02394（代表：岩倉洋一郎，分担：村山正承，紀熙華）、基盤研究（C）21K06955（代表：村山正承）、基盤研究（C）21K07379（代表：有光なぎさ，分担：村山正承，廣津千恵子）、（公財）テルモ生命科学振興財団 2020 年度研究開発助成金（代表：村山正承）、（公財）喫煙科学研究財団 若手研究（代表：村山正承）、（公財）小柳財団 2019 年度研究助成（代表：村山正承）、（公財）上原記念生命科学財団 2019 年度研究奨励金（代表：村山正承）、（学）関西医科大学 2019 年度・2020 年度 KMU 研究コンソーシアム助成（代表：村山正承）、（学）関西医科大学 2020 年度学内研究助成 D1（代表：村山正承）の獲得に繋がった。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講座等名	モデル動物部門	事業推進者名	李 成一
令和元（2019）年度			
＜雑誌論文＞			
1. Arimitsu N, Takai K, Fujiwara N, Shimizu J, Ueda Y, Wakisaka S, Hirotsu C, Murayama MA , Suzuki T, Suzuki N. Roles of Reelin/Disabled1 pathway on functional recovery of hemiplegic mice after neural cell transplantation; Reelin promotes migration toward motor cortex and maturation to motoneurons of neural grafts. Exp Neurol . 2019 Oct;320:112970. 査読有			
2. Tomochika K, Arimitsu N, Murayama MA , Hirotsu C, Nagata K, Takai K, Shimizu J, Akazawa T, Torii Y, Umehara T, Iinuma M, Niki H, Suzuki N. Transplantation of Human iPS Cell-derived Neural Cells with an Artificial Nerve Conduit Leads to Cellular Retention in the Transplanted Area and Improves Motor Function in a Mouse Spinal Cord Injury Model. J. St. Marianna Univ . 2019 Dec;10(2):27-37. 査読有			
3. Shimizu J, Murayama MA , Suzuki N. Relationship between skewed T cell differentiation and gut microbiota alternation in human immunological disorders. Precision Medicine . 2019 Apr 25;2(4):364-368. Japanese. Invited . 査読無			
4. Shimizu J, Murayama MA , Suzuki N. Relationship between skewed T cell differentiation and gut microbiota alternation in human immunological disorders. The Allergy in Practice . 2019 Jul 20;38(7):599-603. Secondary Publication. Japanese. Invited . 査読無			
5. Murayama MA . The pathogenic role of the complement activation in the development of osteoarthritis. BIO Clinica . 2019 Aug 10;34(8):852-853. Japanese. Invited . Corresponding author . 査読無			
6. Murayama MA . Complement system as a therapeutic target for osteoarthritis. Precision Medicine . 2019 Oct 25;2(11):1086-1087. Japanese. Invited . Corresponding author . 査読無			
7. Shimizu J, Murayama MA , Suzuki N. Relationship between skewed T cell differentiation and gut microbiota alternation in human immunological disorders. Agricultural Biotechnology . 2019 Dec 20;3(13):1260-1264. Secondary Publication. Japanese. Invited . 査読無			
＜学会発表＞			
8. 村山正承 , 藤原成芳, 高井憲治, 清水潤, 鈴木登. 認知症モデルマウスを用いたヒト iPS 細胞由来神経細胞移植による認知機能改善における心理症状の評価と関連, 第 66 回日本実験動物学会総会, 福岡県, 2019 年 5 月 15-17 日. 口頭発表(若手優秀発表 ノミネート), ポスター発表.			
9. 角田茂, 小川哲弘, 藤井渉, チェンバーズ ジェームズ, 王辰, 餅井眞太郎, Mark Joseph Desamero, 岩本京夏, 内田萌菜, 村山正承 , 小川修平, 米澤智洋, 中山祐之, 岩倉洋一郎, 久和茂. 普遍的リボスクレアーゼの <i>in vivo</i> 機能解析. 第 9 回オルソオルガノジェネシス検討会, 石川県, 2019 年 7 月 5-6 日. 口頭発表.			
10. 鈴木登, 村山正承 , 有光なぎさ, 高井憲治, 清水潤, 高田えりか, 廣津千恵子. 腫瘍免疫での免疫チェックポイントに対するニコチンの影響. 喫煙科学研究財団平成 30 年度助成研究発表会, 東京都, 2019 年 7 月 23 日. 口頭発表.			
11. Chi HH, Murayama M , Iwakura Y. Elucidating the role of CTRP6 in renal fibrosis and acute kidney failure. 第 84 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 兵庫県, 2019 年 8 月 2-3 日. 口頭発表(若手奨励賞セッション), ポスター発表.			
12. 王辰, 角田茂, 小川哲弘, 岩本京夏, 餅井眞太郎, Desamero Mark Joseph, 藤井渉, チェンバーズ ジェームズ, 内田萌菜, 村山正承 , 小川修平, 米澤智洋, 中山祐之, 岩倉洋一郎, 久和茂. 生物に普遍的に存在する分泌型リボスクレアーゼ遺伝子欠損マウスの表現型解析. 第 84 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 兵庫県, 2019 年 8 月 2-3 日. 口頭発表(若手奨励賞セッション), ポスター発表.			
13. 友近頭, 有光なぎさ, 廣津千恵子, 高井憲治, 村山正承 , 赤澤努, 梅原亮, 飯沼雅央, 清水潤, 仁木久照, 鈴木登. 完全離断精髄損傷マウスモデルに対する神経再生誘導チューブ併用ヒト iPS 細胞由来神経幹/前駆細胞移植の検討. 第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会. 神奈川県. 2019 年 10 月 17-18 日. ポスター発表.			
14. Murayama MA . The therapeutic effect of neural transplantation for Alzheimer's disease. 2019			

Retreat of Advances in Animal Models of Disease & Translational Research. 栃木県, 2019 年 11 月 8-9 日. 口頭発表(招待講演).

15. Ikeda Y, Kondo N, Takeda H, Makita Y, Fukunishi Y, Ueda Y, Sato K, **Murayama M**, Ma B, Isaka Y, Kawai K, Mashimo T, Kamioka Y, Araki M, Omote M, Kinasi T. インテグリン関連疾患治療薬開発に向けた薬剤スクリーニング法の開発. 第 10 回スクリーニング学研究会. 東京都. 2019 年 11 月 22 日. ポスター発表.
16. Chi HH, **Murayama M**, Iwakura Y. The role of CTRP6 in renal tubulointestinal lesions progression, 2019 Keystone Symposia Conference (Innate Immune Receptors: Roles in Immunology and Beyond), Taipei (Taiwan), Mar 10-14, 2019. Poster presentation.
17. 大高時文、中嶋伸介、李成一、上野孝治、任朔華、眺錦春、藤澤順一. HTLV-1 感染ヒト化マウスリンパ球における TaxB および HBZmRNA の発現. 第 6 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 宮崎市. 2019 年 8 月 23-25 日. 口頭発表.
18. 中嶋伸介、大高時文、李成一、藤澤順一. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける感染細胞の表現型解析. 第 6 回日本 HTLV-1 学会学術集会. 宮崎市. 2019 年 8 月 23-25 日. 口頭発表.

<特許申請・取得状況>

1. 発明の名称: Th17 細胞誘導性疾患の予防又は治療剤、及び Th17 細胞誘導性疾患の予防又は、治療剤のスクリーニング方法(Agent for preventing or treating th17 cell-induced disease and screening method for agents for preventing or treating th17 cell-induced disease). 発明者: 岩倉洋一郎, 村山正承, 小野貴裕, 松岡眞子, 権利者: 学校法人 東京理科大学 優先日: 2019 年 8 月 9 日, 出願番号: 特願 2019-148054, 出願日: 2019 年 8 月 9 日, 公知日: 2021 年 2 月 18 日, 国際出願番号: PCT/JP2020/029535, 公開番号: WO2021/029238, 公開日: 2021 年 2 月 18 日

令和 2 (2020) 年度

<雑誌論文>

19. **Murayama MA***, Iwakura Y*. C1q/TNF-related protein 3 regulates chondrogenic cell proliferation via adiponectin receptor 2 (progestin and adipoQ receptor 2). *Translat Regulat Sci*. 2020 Apr;2(1):19-23. *co-corresponding authors. 査読有
20. **Murayama MA**. The relationship between cognitive functions and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *BIO Clinica*. 2020 Apr 10;35(4):377-379. Japanese. **Invited. Corresponding author**. 査読無
21. **Murayama MA**. The development of Alzheimer's disease models. *BIO Clinica*. 2020 Sep 10;35(10):975-977. Japanese. **Invited. Corresponding author**. 査読無
22. Shimizu J, **Murayama MA**, Suzuki N. Relationship between skewed T cell differentiation and gut microbiota alternation in human immunological disorders. *The Allergy in Practice*. 2020 Dec 15;40(14):1210-1214. Secondary Publication. Japanese. **Invited**. 査読無

<学会発表>

23. 村山正承, 紀熙華, 岩倉洋一郎. 変形性関節症における CTRP6 の役割の解析. 第 67 回日本実験動物学会総会. 大阪府. 2020 年 5 月 23-25 日. ポスター発表. 新型コロナウイルス (COVID-19) の感染拡大により誌上開催に変更.
24. 友近顕, 赤澤努, 梅原亮, 飯沼雅央, 仁木久照, 有光なぎさ, 廣津千恵子, 高井憲治, 村山正承, 清水潤, 鈴木登. 全切断脊髄損傷モデルへの人工神経導管併用神経幹細胞移植の治療効果. 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2020 年 10 月 15-16 日. オンラインポスター発表.
25. 植田祥啓, 池田幸樹, 岩田亮一, 赤間智也, 三木貴雄, 住吉麻実, 村山正承, 山崎文和, 平野伸二, 上岡裕治, 近藤直幸, 福原貴太郎. がん微小環境の接着制御機構の解明と接着チェックポイント阻害剤の開発. 第 4 回関西医科大学学術祭. 大阪府. 2020 年 11 月 7 日. 口頭発表.
26. 村山正承, 徳裕圭造, 福田尚代, 上岡裕治, 植田祥啓, 岩井大, 神田晃, 岩田亮一, 林美樹夫. 免疫システム完全ヒト化モデル動物の開発および応用を目指した基礎研究. 第 4 回関西医科大学学術祭. 大阪府. 2020 年 11 月 7 日. 口頭発表.
27. 村山正承. 疾患モデルを用いた免疫疾患発症機構の解明, 関西医科大学 私立大学研究ブランディング事業シンポジウム. 大阪府. 2021 年 1 月 14 日. ポスター発表.

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	樹状細胞、IMiDs、SLE、MMF		
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 東由子 大学院生 重坂実 大学院生			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） ①免疫調節薬（IMiDs）であるレナリドミドとボマリドミドは、多発性骨髄腫の治療に広く使用されている薬剤である。ただし、皮膚のかゆみやアトピー様皮疹の症状が副作用として現れることがある。本研究では、Th1/Th2 免疫応答を制御するヒトミエロイド系樹状細胞（mDC）に対する IMiDs の影響と、Th2-関連アレルギー応答で果たす役割を検定した。臨床的血中濃度のレナリドミドとボマリドミドは、ヒト末梢血 mDC の生存性および成熟マーカーに影響を及ぼさなかった。2 つの IMiDs は、LPS 刺激によって mDC から誘導される IL-12 の産生および STAT4 の発現を抑制した。一方、Th-2 誘導因子である TSLP で刺激すると、mDC は Th2 ケモカインである CCL17 の生産とそのマスターシグナルである STAT6/IRF4 の発現が増加するが、2 つの IMiDs は、この CCL17 の産生と STAT6/IRF4 の発現を大幅に増強し、メモリーTh2 細胞との共培養における Th2 応答を促進した。また、レナリドミドにより治療した骨髄腫患者 46 名において、レナリドミドによる皮疹発症時の血清 CCL17 レベルは、皮疹の発現しなかった患者および治療前の血清よりも有意に高かった。また、レナリドミド治療により、治療効果が良かった患者の血清 CCL17 レベルは、良くなかった患者血清よりも有意に高かった。さらに、time to next treatment は、皮疹の出たレナリドミド治療患者では、皮疹の出なかった患者よりも有意に長かった。レナリドミド投与による副作用としての皮疹は、DC を介した Th2 応答の活性化によって引き起こされるアレルギー反応（アトピー様反応）の結果である可能性があると考えられる。本研究の結果は、IMiDs の副作用と免疫賦活能は、表裏一体の関係であり、IMiDs により Th2 反応という免疫応答が惹起されるほど治療効果は上がると考えられる。 ②全身性エリテマトーデス（SLE）は、自己 DNA という本来反応すべきではない自己成分に対する免疫反応に対する抑制破綻が生じ、全身の臓器に障害を来す自己免疫疾患である。この SLE の病態の基点に I 型インターフェロン（IFN）と樹状細胞（DC）の一亜群である形質細胞様 DC（plasmacytoid DC: pDC）が関与していることが最近の研究で判明している。一方、ミエロイド系 DC（myeloid DC: mDC）も自己反応性細胞の誘導や抗原提示によって SLE 病態に関与している。ミコフェノール酸モフェチル（MMF）は、移植拒絶反応やループス腎炎の治療に用いられる薬剤である。しかし、MMF のヒト DC サブセットに対する薬理作用の報告はほとんどなく、特に pDC に対する影響はこれまで報告されていないことから、SLE 病態に有効である理由は不明であった。本研究はヒト DC サブセットに対する MMF の制御的作用を検討することを目的とした。常用量 MMF を投与した場合の生体内トラフ血中濃度である 1・10 ⁻⁶ ・M MMF/MPA（MPA は生体な活性物質名）で、DC サブセットいずれも、障害性は誘導されなかった。MPA は、pDC に対し、CD80・CD86 の発現には影響しなかったが IFN-α・TNF の分泌を用量依存的に抑制した。さらに I 型 IFN の産生に必須である転写因子 IRF7 の核内移行と AKT の活性化を抑制した。mDC に対しては CD80・CD86 の発現と、IL-12・TNF の分泌を抑制した。さらに Th1 関連の転写因子 STAT4 の mRNA 発現低下を誘導した。近年、SLE の腎病変における MMF の有用性が明らかとなっており、難治例・再発例に対しても奏功することが報告されている。MPA がヒト DC サブセットを抑制することによって、SLE 病態の進展を制御出来る可能性を示した。			

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) Phan V, <u>Ito T</u>, Inaba M, <u>Azuma Y</u>, Kibata K, Inagaki-Katashiba N, Tanaka A, <u>Satake A</u>, <u>Nomura S</u>. Immunomodulatory drugs suppress Th1-inducing ability of dendritic cells but enhance Th2-mediated allergic responses. Blood Adv. 4:3572-3585. 2020 <u>Minoru Shigesaka</u>, <u>Tomoki Ito</u>, Muneo Inaba, Kai Imai, Hideki Yamanaka, <u>Yoshiko Azuma</u>, Akihiro Tanaka, Hideki Amuro, Tohru Nishizawa, Yonsu Son, <u>Atsushi Satake</u>, Yoshio Ozaki, <u>Shosaku Nomura</u>. Mycophenolic acid, the active form of mycophenolate mofetil, interferes with IRF7 nuclear translocation and type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells Arthritis Res Ther.; 22: 264. 2020 Tanaka A, <u>Ito T</u>, Kibata K, Inagaki-Katashiba N, Amuro H, Nishizawa T, Son Y, Ozaki Y, <u>Nomura S</u>. Serum high-mobility group box 1 is correlated with interferon-α and may predict disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. Lupus. 8:1120-1127. 2019 <u>Shosaku Nomura</u>, Takehito Taniura, <u>Tomoki Ito</u> Extracellular vesicle-related thrombosis in viral infection" International Journal of General Medicine 13 ; 559-568. 2020 <図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数) <u>伊藤 量基</u>. 科学評論社 多発性骨髄腫における抗体医薬エロツズマブ・ダラツムマブの作用機序および治療選択. 血液内科 2020 8 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) <u>Yoshiko Azuma</u>, <u>Tomoki Ito</u>, Muneo Inaba, Kai Imai, Masaaki Hotta, <u>Atsushi Satake</u>, <u>Shosaku Nomura</u>. Elotuzumab enhances the Th2-mediated immune response of dendritic cell induced by Immunomodulatory Drugs (IMiDs). ASH 2018 - 61th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition フロリダ 米国 2019 年 12 月 <特許申請・取得状況> 特願 2020-115916 (出願日 2020/7/3) 名称:「活動的全身性エリテマトーデスの鑑別用バイオマーカー」 出願人: 学校法人関西医科大学			

研究成果報告書の概要

講座等名	内科学第三講座	事業推進者名	長沼 誠
所属部門	がん部門		
分担研究課題	慢性炎症と発癌に関する病態解明と治療戦略		
キーワード	大腸がん 潰瘍性大腸炎 細胞外小胞		
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） 長沼誠 研究総括 論文作成 福井寿朗 堀谷俊介 消化管がん発癌・進展・転移メカニズムの解析 富山尚 小林三四郎 消化器疾患の病態に關与する細胞外小胞の關与 浦上富生 CD4-dnTGF β RII マウスを用いた大腸炎関連癌の新規マウスモデルの確立			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） 我々は内視鏡下切除検体を消化管がん発癌・進展・転移メカニズムの解析、大腸がん肺転移における細胞外小胞の關与に関する研究、慢性大腸炎関連大腸がんの平坦型腫瘍を作成するためのマウスモデルの作成、に関する研究をおこなってきた。 消化管がん発癌・進展・転移メカニズムの解析については、2019-2020 年度にかけて、食道癌や大腸癌の内視鏡切除後臨床検体や大腸癌モデルマウスを用いた研究を行い、発癌・進展・転移メカニズムの解析や病変進展度のバイオマーカーとしての役割を明らかにしてきた。ヒト食道癌の癌幹細胞と発癌機構および進行大腸癌モデルマウスの作製と癌幹細胞との關係については 2020 年度に成果を論文として公表することができた(Horitani S, Fukui T et al. Dig Dis Sci. 2021 ;66:1862-1874.Tanimura T, Fukui T, et al Oncol Lett. 2021;21:7)。 消化器疾患の病態に關与する細胞外小胞の關与については、大腸癌肺転移における調節性 T 細胞の關与について研究を行なっている。細胞外小胞(extracellular vesicles; EVs)はあらゆる細胞から分泌される小胞であり、その由来となる細胞の細胞膜や細胞内蛋白質、核酸を内包する。EVs は受け手となる細胞に取り込まれ、その免疫学的変化をもたらし、生体内の恒常性の維持に関わるだけでなく、様々な疾患の病態に關与していることが知られている。2019 年度は 1 型自己免疫性膵炎（1 型 AIP）患者の循環中の exosome はアルコール性慢性膵炎、健常者と比べて miR-21 が高発現していること、膵組織での炎症細胞で miR-21 が高発現していることを解明し、論文および学会報告した(Tomiyama T, et al. Pancreatology. 2020 Apr;20(3):318-324。また現在は、大腸癌肺転移モデルを用いて、癌細胞が放出する EVs のがん進行の抑制的効果について調節性 T 細胞の表面マーカーである、FOXP3、CD103 を用いて検討を行なっている。 潰瘍性大腸炎において慢性炎症に伴い大腸がんが発生することが知られている。現現在大腸炎関連発癌のモデルマウスとしては AOM/DSS マウスがよく知られており、研究でも広く使用されている。そのモデルマウスの癌は多くは隆起病変であることが多いがヒトの大腸炎関連発癌は平坦病変であることが多いと言われている。2019-2020 年にかけて、ヒトの大腸炎関連発癌の型に近いモデルマウスの作成を行なっており、自然に炎症性腸疾患を発症する遺伝子改変マウスである CD4-dnTGF β RII マウスに、遺伝毒性大腸発がん物質であるアゾキシメタン（AOM）の腹腔内単回投与を投与量や投与時期を変えて行い、大腸がんにおける肉眼的特徴の相違について検討を行なってきた。その結果、12 週齢の CD4-dnTGF β RII マウスに AOM を 15mg/kg/body で投与した群は投与 10 週後、20 週後どちらも 100%で癌が発生し、特に多発かつ平坦型の腫瘍病変が確認することができた。肉眼的には潰瘍性大腸炎関連大腸がんに類似したものと考えられた。それらの腫瘍は免疫組織化学染色で β カテニン、ki67、Sox9 に対して陽性であったが、p53 免疫組織化学染色は陽性を示さなかった。本成果は現在論文投稿準備中である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	内科学第三講座	事業推進者名	長沼 誠
<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. Tsukuda S, Ikeura T, Ito T, Nakamaru K, Masuda M, Hori Y, Ikemune M, Yanagawa M, Tanaka T, <u>Tomiyama T</u>, Yamaguchi T, <u>Ando Y</u>, Uchida K, Fukui T, Nishio A, Terasawa R, Tanigawa N, Okazaki K. Clinical implications of elevated serum interleukin-6 in IgG4-related disease. PLoS ONE. 15(1):e0227479. 2019. 査読あり 2. Aoi K, Nishio A, Okazaki T, Takeo M, Masuda M, <u>Fukui T</u>, Uchida K, Okazaki K. Inhibition of the dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 2alpha ameliorates murine experimental pancreatitis. Pancreatology. 19(4):548-556. 2019. 査読あり 3. <u>Horitani S</u>, <u>Fukui T</u>, Tanimura Y, Matsumoto Y, Miyamoto S, Tanaka T, <u>Tomiyama T</u>, Ikeura T, <u>Ando Y</u>, Nishio A, Okazaki K. Specific Smad2/3 Linker Phosphorylation Indicates Esophageal Non-neoplastic and Neoplastic Stem-Like Cells and Neoplastic Development. Digestive diseases and sciences. Online ahead of print. 2020. 4. Nakamaru K, <u>Tomiyama T</u>, Kobayashi S, Ikemune M, Tsukuda S, Ito T, Tanaka T, Yamaguchi T, <u>Ando Y</u>, Ikeura T, <u>Fukui T</u>, Nishio A, Takaoka M, Uchida K, Leung PSC, Gershwin ME, Okazaki K. Extracellular vesicles microRNA analysis in type 1 autoimmune pancreatitis: Increased expression of microRNA-21. Pancreatology. レフェリー有. 20(3):318-324. 2020 査読あり <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>富山尚</u>, 中丸洗, 内田一茂, 岡崎和一. 1型自己免疫性膵炎のTh2免疫バランスに関わる疾患エクソソーム内microRNA. 第53回 日本消化器免疫学会総会. 京都. 2019年8月1日. ・◎Hori Y, Ikeura T, Yamaguchi T, <u>Tomiyama T</u>, <u>Ando Y</u>, Yoshida K, Fukui T, Uchida K, Takaoka M, Matsuzaki K, Nishio A, Ishida M, Sato S, Okazaki K. Analysis of phosphorylated Smad3 signaling in the intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. 50th anniversary meeting of American pancreatic association/Japan pancreas society. Maui, USA. 2019年8月11日. ・◎<u>富山尚</u>, 中丸洗, 池浦司, M. E. Gershwin, 岡崎和一, <u>長沼誠</u>. 1型自己免疫性膵炎の末梢および膵組織では micro-RNA-21 が高発現する. 第57回日本消化器免疫学会総会. 誌上開催. 2020年7月1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	外科学講座	事業推進者名	海堀 昌樹
所属部門	①②代謝部門 ③がん部門		
分担研究課題	①②誘導型一酸化窒素合成酵素発現を指標とした培養細胞および臓器障害モデル動物を用いた薬剤の保護効果とメカニズムの解析 ③肝細胞癌に対する抗癌剤内包 PCL (ポリカプロラクトン) ファイバーシートを用いた新規局所治療デバイスの開発		
キーワード	①②nitric oxide synthase, nuclear factor-κB, rat primary cultured hepatocyte, rat liver injury model③ PCL、スマートシート、Drug Delivery System		
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) ①②企画 (テーマ、人員構成、財源) (3); 海堀昌樹, 奥村忠芳, 関本貢嗣 実験と解析 (7); 松島英之, 菱川秀彦, 中竹利知, 坂口達馬, 小塚雅也, 橋本祐希, 八田雅彦 考察、論文校正 (6); 海堀昌樹, 奥村忠芳, 関本貢嗣, 石崎守彦, 松井康輔, 徳原 克治 ③企画 (テーマ、人員構成、財源) (3); 海堀昌樹, 奥村忠芳, 関本貢嗣 実験と解析 (7); 吉田明史, 菱川秀彦, 松島英之, 坂口達馬, 小塚 雅也, 橋本祐希, 八田雅彦 考察、論文校正 (5); 海堀昌樹, 奥村忠芳, 関本貢嗣, 石崎守彦, 松井康輔			
研究成果の概要 (令和元 (2019)・令和2 (2020) 年度の研究成果について) ①オメプラゾール(omeprazole, LPZ)は proton pump inhibitor (PPI)として、臨床で広く使用されている。LPZ 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、2 つのラット急性肝障害モデル (GalN/LPS と 70%肝切除/LPS) の survival rate を有意に増加させた[論文 in preparation]。オルプリノン (olprinone, OLP) は急性心不全治療薬として知られているカルシウムセンシタイザーである。LPZ と同様に、ラット初代培養肝細胞において、iNOS 誘導/NO 産生を抑制する。さらに、70%肝切除/LPS モデルの survival rate を増加し、様々な炎症性メディエーターの産生を阻害した[論文 in preparation]。 ②漢方薬“柴苓湯 saireito”がラット初代培養肝細胞において、NO 産生を阻害することより、“柴苓湯 saireito”の肝保護効果を報告した。本研究では“柴苓湯 saireito”の 12 herbs の効果を検討し、柴苓湯 saireito の 12 herbs のうち、半夏 hange を除いた 11 herbs で NO 産生の阻害を示した。特に、黄芩オウゴン ougon と桂皮ケイヒ keihi が iNOS 誘導を抑制し、強い NO 産生の阻害を示したが、桂皮ケイヒ keihi は IkBα 分解を綺麗に抑えることで、NF-κB 活性化を阻害している一方、黄芩オウゴン ougon は Akt 活性化を阻害し、IL-1RI 増幅を阻害しており、両者の阻害メカニズムは異なることを明らかになった [11]。[11] Matsushima H et al. Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes. Traditional and Kampo Medicine, April 2020; 7(1): 38-47. ③進行癌に対する抗癌剤治療は全身投与が一般的で、癌局所のみならず正常組織にも作用して副作用が現れる為、高い抗腫瘍効果を認めるにもかかわらず、副作用の為に化学療法を中止せざるを得ない場合も多い。本研究では、生体分解能を持ち、内包させた薬剤を長期間徐放する事ができるポリカプロラクトン(PCL)をナノ繊維状に加工したスマートシートに、肝細胞癌治療薬であるレンバチニブを内包させたレンバチニブ内包スマートシートを作製して肝細胞癌局所に直接貼付する事で、全身投与と比較して少ない薬剤使用量で抗腫瘍効果を維持した上で副作用を軽減し得るか評価した。BALB/c ノードマウスの皮下に高分化型ヒト肝癌由来細胞株である HuH-7 を移植するヒト肝細胞癌皮下移植マウスモデルを用いて、経口投与 (10mg/kg/day) 群、レンバチニブ内包シート皮下貼付群 (対経口比 35%に減量) での抗腫瘍効果、有害事象の比較する実験では、経口投与量 (10mg/kg/day×14days) の約 35%に減量したレンバチニブ 1.0mg/14days を含有したレンバチニブ内包シートは、経口投与群と比較して、シート貼付後 14 日目の腫瘍体積増加が 53.6% 抑制され、体重減少を認めず、高い抗腫瘍効果と副作用低減の可能性が示唆された。[論文 in preparation]。			

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	長沼 誠
<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. Tsukuda S, Ikeura T, Ito T, Nakamaru K, Masuda M, Hori Y, Ikemune M, Yanagawa M, Tanaka T, <u>Tomiyama T</u>, Yamaguchi T, <u>Ando Y</u>, Uchida K, Fukui T, Nishio A, Terasawa R, Tanigawa N, Okazaki K. Clinical implications of elevated serum interleukin-6 in IgG4-related disease. PLoS ONE. 15(1):e0227479. 2019. 査読あり 2. Aoi K, Nishio A, Okazaki T, Takeo M, Masuda M, <u>Fukui T</u>, Uchida K, Okazaki K. Inhibition of the dephosphorylation of eukaryotic initiation factor 2alpha ameliorates murine experimental pancreatitis. Pancreatology. 19(4):548-556. 2019. 査読あり 3. <u>Horitani S</u>, <u>Fukui T</u>, Tanimura Y, Matsumoto Y, Miyamoto S, Tanaka T, <u>Tomiyama T</u>, Ikeura T, <u>Ando Y</u>, Nishio A, Okazaki K. Specific Smad2/3 Linker Phosphorylation Indicates Esophageal Non-neoplastic and Neoplastic Stem-Like Cells and Neoplastic Development. Digestive diseases and sciences. Online ahead of print. 2020. 4. Nakamaru K, <u>Tomiyama T</u>, Kobayashi S, Ikemune M, Tsukuda S, Ito T, Tanaka T, Yamaguchi T, <u>Ando Y</u>, Ikeura T, <u>Fukui T</u>, Nishio A, Takaoka M, Uchida K, Leung PSC, Gershwin ME, Okazaki K. Extracellular vesicles microRNA analysis in type 1 autoimmune pancreatitis: Increased expression of microRNA-21. Pancreatology. レフェリー有. 20(3):318-324. 2020 査読あり <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>富山尚</u>, 中丸洗, 内田一茂, 岡崎和一. 1型自己免疫性膵炎のTh2免疫バランスに関わる疾患エクソソーム内microRNA. 第53回 日本消化器免疫学会総会. 京都. 2019年8月1日. ・◎Hori Y, Ikeura T, Yamaguchi T, <u>Tomiyama T</u>, <u>Ando Y</u>, Yoshida K, Fukui T, Uchida K, Takaoka M, Matsuzaki K, Nishio A, Ishida M, Sato S, Okazaki K. Analysis of phosphorylated Smad3 signaling in the intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. 50th anniversary meeting of American pancreatic association/Japan pancreas society. Maui, USA. 2019年8月11日. ・◎<u>富山尚</u>, 中丸洗, 池浦司, M. E. Gershwin, 岡崎和一, <u>長沼誠</u>. 1型自己免疫性膵炎の末梢および膵組織では micro-RNA-21 が高発現する. 第57回日本消化器免疫学会総会. 誌上開催. 2020年7月1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	外科学講座	事業推進者名	海堀 昌樹
所属部門	①②代謝部門 ③がん部門		
分担研究課題	①②誘導型一酸化窒素合成酵素発現を指標とした培養細胞および臓器障害モデル動物を用いた薬剤の保護効果とメカニズムの解析 ③肝細胞癌に対する抗癌剤内包 PCL（ポリカプロラクトン）ファイバーシートを用いた新規局所治療デバイスの開発		
キーワード	①②nitric oxide synthase, nuclear factor-κB, rat primary cultured hepatocyte, rat liver injury model③ PCL、スマートシート、Drug Delivery System		
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） ①②企画（テーマ、人員構成、財源）(3)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣 実験と解析(7)；松島英之，菱川秀彦，中竹利知，坂口達馬，小塚雅也，橋本祐希，八田雅彦 考察、論文校正(6)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣，石崎守彦，松井康輔，徳原 克治 ③企画（テーマ、人員構成、財源）(3)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣 実験と解析(7)；吉田明史，菱川秀彦，松島英之，坂口達馬，小塚 雅也，橋本祐希，八田雅彦 考察、論文校正(5)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣，石崎守彦，松井康輔			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） ①オメプラゾール(omeprazole, LPZ)は proton pump inhibitor (PPI)として、臨床で広く使用されている。LPZ 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、2 つのラット急性肝障害モデル（GalN/LPS と 70%肝切除/LPS）の survival rate を有意に増加させた[論文 in preparation]。オルプリノン（olprinone, OLP）は急性心不全治療薬として知られているカルシウムセンシタイザーである。LPZ と同様に、ラット初代培養肝細胞において、iNOS 誘導/NO 産生を抑制する。さらに、70%肝切除/LPS モデルの survival rate を増加し、様々な炎症性メディエーターの産生を阻害した[論文 in preparation]。 ②漢方薬“柴苓湯 saireito”がラット初代培養肝細胞において、NO 産生を阻害することより、“柴苓湯 saireito”の肝保護効果を報告した。本研究では“柴苓湯 saireito”の 12 herbs の効果を検討し、柴苓湯 saireito の 12 herbs のうち、半夏 hange を除いた 11 herbs で NO 産生の阻害を示した。特に、黄芩オウゴン ougon と桂皮ケイヒ keihi が iNOS 誘導を抑制し、強い NO 産生の阻害を示したが、桂皮ケイヒ keihi は IkBα 分解を綺麗に抑えることで、NF-κB 活性化を阻害している一方、黄芩オウゴン ougon は Akt 活性化を阻害し、IL-1RI 増幅を阻害しており、両者の阻害メカニズムは異なることを明らかになった [11]。[11] Matsushima H et al. Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes. Traditional and Kampo Medicine, April 2020; 7(1): 38-47. ③進行癌に対する抗癌剤治療は全身投与が一般的で、癌局所のみならず正常組織にも作用して副作用が現れる為、高い抗腫瘍効果を認めるにもかかわらず、副作用の為に化学療法を中止せざるを得ない場合も多い。本研究では、生体分解能を持ち、内包させた薬剤を長期間徐放する事ができるポリカプロラクトン(PCL)をナノ繊維状に加工したスマートシートに、肝細胞癌治療薬であるレンバチニブを内包させたレンバチニブ内包スマートシートを作製して肝細胞癌局所に直接貼付する事で、全身投与と比較して少ない薬剤使用量で抗腫瘍効果を維持した上で副作用を軽減し得るか評価した。BALB/c ノードマウスの皮下に高分化型ヒト肝癌由来細胞株である HuH-7 を移植するヒト肝細胞癌皮下移植マウスモデルを用いて、経口投与（10mg/kg/day）群、レンバチニブ内包シート皮下貼付群（対経口比 35%に減量）での抗腫瘍効果、有害事象の比較する実験では、経口投与量（10mg/kg/day×14days）の約 35%に減量したレンバチニブ 1.0mg/14days を含有したレンバチニブ内包シートは、経口投与群と比較して、シート貼付後 14 日目の腫瘍体積増加が 53.6% 抑制され、体重減少を認めず、高い抗腫瘍効果と副作用低減の可能性が示唆された。[論文 in preparation]。			

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) 2019(R1) 1. Dwijayanti DR, Okuyama T, <u>Okumura T</u>, Ikeya Y, Nishizawa M. The anti-inflammatory effects of Indonesian and Japanese bitter melon (<i>Momordica charantia</i> L.) fruit extracts on interleukin-1β-treated hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i>, 2019;9(1): 16-33. 2. <u>Sakaguchi T</u>, Hashimoto Y, Matsushima H, Hishikawa H, Nishizawa N, <u>Okumura T</u>, Kaibori M. Levosimendan pretreatment improves survival of septic rats after partial hepatectomy and suppresses iNOS induction in cytokine-stimulated hepatocytes. <i>Scientific Reports</i>; (2019) 9:13398. 3. Nishizawa M, <u>Okumura T</u>, 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. 4. <u>Nakatake R</u>, Hishikawa H, Kotsuka M, Ishizaki M, <u>Matsui K</u>, Nishizawa M, Yoshizawa K, <u>Kaibori M</u>, <u>Okumura T</u>. The proton pump inhibitor lansoprazole has hepatoprotective effects in in vitro and in vivo rat models of acute liver injury. <i>Dig Dis Sci</i>, 2019; 64: 2854-2866. 5. <u>Ueyama Y</u>, Tokuhara T, Miki H, <u>Nakatake R</u>, <u>Sakaguchi T</u>, Nishizawa M, <u>Kaibori M</u>, <u>Okumura T</u>. AHCC® has protective effects in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. <i>J Surg Res</i>. 2019 Jun 26; 243: 265-273. 6. <u>Hishikawa H</u>, <u>Kaibori M</u>, Tsuda, T, <u>Matsui K</u>, <u>Okumura T</u>, Ozeki E, Yoshii K. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for gallbladder cancer. <i>Oncotarget</i>. 2019 Sep 24; 10(54): 5622-5631. 7. Ishii T, Okuyama T, Noguchi N, Nishidono Y, <u>Okumura T</u>, <u>Kaibori M</u>, Tanaka K, Terabayashi S, Ikeya Y, Nishizawa M. Anti-inflammatory constituents in <i>Atractylodes chinensis</i> rhizome improve glomerular lesions in immunoglobulin A nephropathy model mice. <i>J Nat Med</i>. 2020 Jan; 74(1): 51-64. 8. Tsuda T, Miki H, <u>Nakatake R</u>, <u>Sakaguchi T</u>, Hatta M, <u>Okumura T</u>, Nishazawa M, <u>Kaibori M</u>. Essential amino acid tryptophan inhibits induction of inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1β stimulated hepatocytes. <i>Bioactive Compounds in Health and Disease</i>, 2019; 2(7): 170-182. 9. Ozaki T, Kawaguchi Y, <u>Matsui K</u>, Kotsuka M, Iida H, <u>Kaibori M</u>, Nishizawa M, <u>Okumura T</u>, Sekimoto M. Effects of medicinal plant ipe on expression of inducible nitric oxide synthase in interleukin-1β-stimulated Hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i>, 2019; 9(10): 648-661. 10. <u>Matsushima H</u>, <u>Kaibori M</u>, Hatta M, Ishizaki M, <u>Nakatake R</u>, <u>Okumura T</u>, Yoshii K, Todo T. Efficacy of a third-generation oncolytic herpes simplex virus in neuroendocrine tumor xenograft models. <i>Oncotarget</i>, 12-16-2019 in press. <i>Oncotarget</i>. 2019 Dec 24; 10(67): 7132-7141. doi: 10.18632/oncotarget.27391. eCollection 2019 Dec 24. 2020(R2) 11. <u>Matsushima H</u>, <u>Hishikawa H</u>, Miki H, <u>Hatta M</u>, <u>Nakatake R</u>, <u>Okumura T</u>, Nishizawa M, <u>Kaibori M</u>, Sekimoto M. Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes. <i>Traditional and Kampo Medicine</i>, April 2020; 7(1): 38-47. 12. Ningsih FN, Okuyama T, To S, Nishidono Y, <u>Okumura T</u>, Tanaka K, Ikeya Y, Nishizawa M. Comparative Analysis of Anti-inflammatory Activity of the Constituents of the Rhizome of <i>Cnidium officinale</i> Using Rat Hepatocytes. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 2020; 43; 1867-1875. <国際学会発表> (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>Masahiko Hatta</u>, Takumi Tsuda, Hirokazu Miki, <u>Richi Nakatake</u>, <u>Tatsuma Sakaguchi</u>, <u>Tadayoshi Okumura</u>, Mikio Nishizawa, <u>Masaki Kaibori</u>. Essential amino acid tryptophan inhibits induction of inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1β stimulated hepatocytes. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019). 2. <u>Masaya Kotsuka</u>, <u>Richi Nakatake</u>, <u>Yuki Hashimoto</u>, <u>Masahiko Hatta</u>, <u>Terufumi Yoshida</u>, <u>Masaki Kaibori</u>, Mikio Nishizawa, <u>Tadayoshi Okumura</u>. Omeprazole inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat primary cultured hepatocytes. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019). 3. <u>Yuki Hashimoto</u>, <u>Masaya Kotsuka</u>, <u>Masahiko Hatta</u>, <u>Richi Nakatake</u>, <u>Tatsuma Sakaguchi</u>, Mikio Nishizawa, <u>Tadayoshi Okumura</u>, <u>Masaki Kaibori</u>. Sulforaphane has a liver-protective effect through the suppression of inducible nitric oxide synthase. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019). 4. <u>Katsuji Tokuhara</u>, <u>Yosuke Ueyama</u>, <u>Tadayoshi Okumura</u>. The protective effects of AHCC® in			

- ischemia-reperfusion injury of the small intestine. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019).
5. Masaya Kotsuka, Richi Nakatake, Yuki Hashimoto, Masahiko Hatta, Terufumi Yoshida, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Mitsugu Sekimoto. Omeprazole inhibits a production of proinflammatory biomarker nitric oxide in interleukin-1 β stimulated hepatocytes. 41thESPEN (Krakow, Poland, August 31-September 3, 2019).
 6. Richi Nakatake, Takumi Tsuda, Hirokazu Miki, Tatsuma Sakaguchi, Masaya Kotsuka, Masaki Kaibori, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa, Mitsugu Sekimoto. Essential amino acid tryptophan has a liver-protective effect through the suppression of inducible nitric oxide synthase in primary cultured rat hepatocytes. 41thESPEN (Krakow, Poland, August 31-September 3, 2019).
 7. Masaya Kotsuka, Masahiko Hatta, Hideyuki Matsushima, Hidehiko Hishikawa, Hirokazu Miki, Richi Nakatake, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa, Masaki Kaibori, Mitsugu Sekimoto. Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes. 42thESPEN2020 (Lyon, France, September 19-22, 2020).
 8. Terufumi Yoshida, Takashi Ozaki, Yusai Kawaguchi, Kosuke Matsui, Masaya Kotsuka, Hiroya Iida, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Mitsugu Sekimoto. Effects of medicinal plant ipe on expression of inducible nitric oxide synthase in interleukin-1 β -stimulated Hepatocytes. 42thESPEN2020 (Lyon, France, September 19-22, 2020).
 9. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Masaya Kotsuka, Tetsuya Okuyama, Katsuhiko Yoshizawa, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Rene H. Tolba, Mitsugu Sekimoto. The proton pump inhibitor lansoprazole inhibits the expression of proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. 42thESPEN2020 (Lyon, France, September 19-22, 2020).
 10. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Masaya Kotsuka, Katsuhiko Yoshizawa, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Rene H. Tolba, Mitsugu Sekimoto. Protective effect of the proton pump inhibitor lansoprazole in lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats. 2020 ESSR (Innsbruck, Austria, December 9-11, 2020).

< 特許申請・取得状況 >

特記事項なし

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	がん部門		
分担研究課題	泌尿器科がん疾患における、転写因子 Ovol2 の発現と mesenchymal-epithelial transition (MET)との関連性に関する研究		
キーワード	泌尿器科がん、Ovol2、MET、腎がん		
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） 谷口久哲：研究全般の実施 松田公志：研究全体の総括			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） Ovo Like Zinc Finger 2 (Ovol2)遺伝子はZing-finger ドメインを有する転写因子で、本学においてショウジョウバエから同定された。これまで Ovol2 は様々な臓器の発生に関与していることが明らかとなっているが、近年がんの発生においても Ovol2 の関与が注目されるようになってきた。そこで我々は、泌尿器科領域における腎がんにおいて、Ovol2 の発現の有無について検討を行うとともに、Ovol2 とがんの進展・転移にかかわるとされる、上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT/MET) との関連性について検討を行った。 まず、当科において 2008 年から 2010 年の間に行った 96 例の腎がん手術の組織検体を後ろ向きに再評価し、病理学的悪性度を検証した。組織は外科的に採取されたホルマリン固定のパラフィン切片 (FFPE) で、histological subtype, stage, 2012 International Society of Urological Pathology (ISUP) tumor grade (腫瘍細胞の悪性度)、腫瘍サイズなどを評価した。次に、Ovol2 が腎がん組織に存在するかを検討するために、RNAscope (<i>in situ</i> hybridization)を行った。正常組織とがん組織の両方が含まれる切片をランダムに抽出し 2 つの連続組織切片を作成。一方の切片に RNAscope <i>in situ</i> hybridization を行い Ovol2 の発現を検討、他方は HE 染色を行い正常組織部位とがん組織部位の鑑別を行った。その結果、Ovol2-mRNA は腎の組織において正常組織部位、がん組織部位の両方に発現していることが明らかとなった。(Fig 1) さらに、Ovol2-mRNA は ISUP tumor grade が低い組織の方が ISUP grade が高い組織よりもより多く発現していた。 引き続き、我々は 96 の FFPE 検体から Tissue microarray (TMA)を作成した。がん組織標本のうち、最も全組織に占める範囲が広く、grade が高い組織をそれぞれの検体において 2 か所ずつ採取し、TMA を作成した。この TMA 切片をホモゲナイズし RNA を抽出した。そして、nCounter assay を行い、TMA における Ovol2 の RNA 量について検討を行った。その結果、Ovol2-RNA は ISUP grade の低いグループの方が、ISUP grade の高いグループよりも発現が多かった。(Fig 2a) また Ovol2-RNA は Ovol2 の相同遺伝子である Ovol1 の Ovol1-RNA の発現と正の相関を示した。(Fig 2b) Ovol2 と EMT 関連遺伝子の発現の関連性において、CDH1, CDH2, VIM, GRHL2, ZEB1 の RNA 発現量との検討を行った。Ovol2-RNA の発現は GRHL2-RNA の発現と弱い正の相関を示し、CDH2-RNA の発現と弱い負の相関を示した。GRHL2 は MET 関連遺伝子であり、CDH2 は EMT 関連遺伝子である。Ovol2-RNA の発現量と CDH1, VIM, ZEB1-RNA の発現量との相関は認めなかった。 以上の結果から、Ovol2 遺伝子は腎がんの進展において EMT 関連因子として働いていることが示唆された。今後 Ovol2 関連遺伝子と腎がんの進展におけるさらなる研究を行う予定である。			

Fig 1. *Ovol2*-mRNA expression in clear cell renal cell carcinoma in RNAscope section

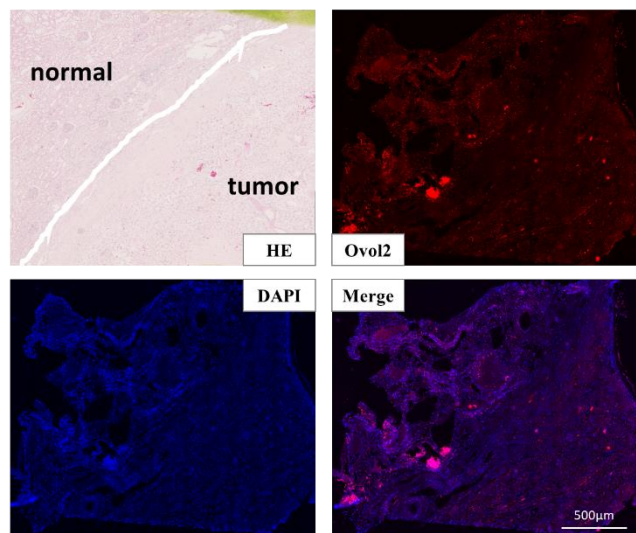
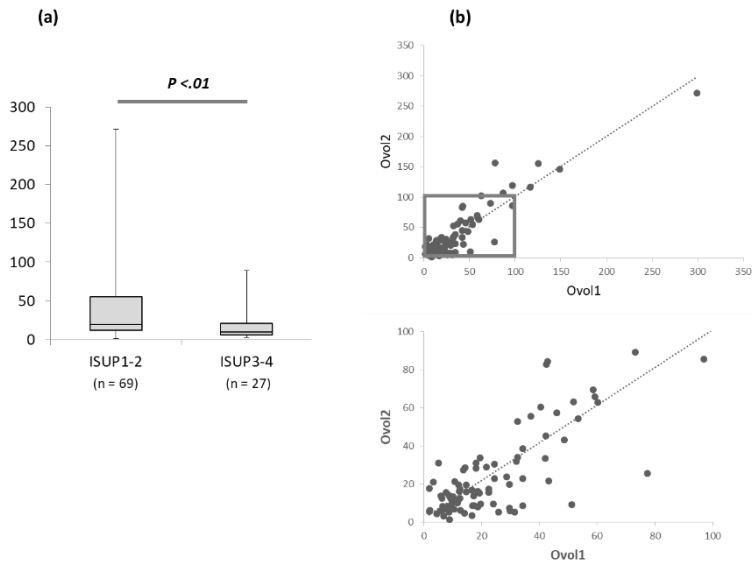


Fig 2.



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） 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	薦 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	網羅的遺伝子発現解析、胸腺癌、腎細胞癌、乳癌		
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） 薦 幸治：病理学講座 教授 「研究の統括」、「研究計画の立案」 石田光明：病理学講座 講師 「研究計画の立案」、「データの収集、解析」 大江知里：病理学講座 講師 「研究計画の立案」、「データの収集、解析」 吉川勝広：外科学講座 大学院生 「データの収集、解析」 査 林君：病理学講座 大学院生 「データの収集、解析」 池田純一：腎泌尿器外科学講座 大学院生 「データの収集、解析」			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） 2019～2020 年度は、臨床各科と連携して腎泌尿器や乳腺、口腔領域の癌腫を中心に、予後予測や治療選択に関わるバイオマーカーの探索を行った。病理診断後の残余検体であるホルマリン固定後のパラフィン包埋組織から組織マイクロアレイの作製や核酸抽出を行うことにより、免疫組織化学的および分子病理学的解析を行っている。 各チームで、nCounter システムによる mRNA デジタルカウントや次世代シーケンサーなどを用いて、発癌メカニズムや癌微小環境に関連する遺伝子の解析などの分子病理学的な研究を遂行している。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。PRAME タンパク質は組織学的な鑑別マーカーのみでなく、血清腫瘍マーカーとして使用できないかということを考慮し、ELISA による検討を開始している。 乳癌ではトリプルネガティブ乳癌を中心に臨床病理学的検討を行っている。術前治療による腫瘍縮小効果の MRI 画像と実際の病理画像の相関について検討を行い予測式を見いだすことが出来た。また、細胞の脂質代謝に関与する adipophilin に陽性を示す乳癌は予後不良で、術前化学療法を受けていない群では有意に再発が多いことを証明した。 腎癌の領域では、ClearCode34 などの発癌メカニズムに関与するパネルを用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、日本人におけるコホートでも予後良好な ccA と予後不良な ccB の 2 群に分けられることを初めて明らかにした。前者は低酸素や血管新生に関与、後者は上皮間葉転換に関与する mRNA の発現が高く、これらは治療反応性にも関連するが、日常診療で mRNA の発現を検討することは困難である。今回、分子病理学的異常と組織形態や蛋白発現との関連を明らかにしたため、さらに、日常診療で簡易に判定できる予後予測や治療効果予測システムの構築を目指して解析を進めている。 さらに、遺伝子解析で得られた知見を、in situ hybridization 法や免疫組織学的手法により可視化し、組織形態との相関を明らかにすることも試みている。また、肺癌の領域では、3D プリンターを用いて、2 次元の病理標本を 3 次元に立体構築し、癌の増殖や進展に関する検討も行っている。このような形態異常、蛋白異常、遺伝子異常を包括して病因や病態を把握する研究を通して、その成果を日々の病理診断に還元することも心がけている。 次年度からは、臨床病理学講座と実験病理学講座の統合により、動物モデルやオルガノイドなどを用いた検証を行うことができる環境になるため、臨床病理学的解析から得られた仮説の立証を目指していく予定である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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) ・Ishida M, Okano K, Sandoh K, Ito H, Ikeura T, Mitsuyama T, Miyoshi H, Shimatani M, Takaoka M, Okazaki K, Tsuta K.・Neuroendocrine carcinoma diagnosis from bile duct cytological specimens: A retrospective single-center study.・Diagnostic cytopathology・あり・48(2):154-158・2020/02 ・Sandoh K, Ishida M, Okano K, Miyasaka C, Mori S, Tokuhara M, Suzuki R, Okazaki T, Nakamura N, Tsuta K.・Utility of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology in rapid on-site evaluation for the diagnosis of gastric submucosal tumors: Retrospective analysis of a single-center experience.・Diagnostic cytopathology・あり・47(9):869-875・2019/09” ・Ishida M, Okano K, Sandoh K, Ebisu Y, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K.・Cytological features of basal cell adenoma of salivary glands: Analysis of 19 cases emphasizing stromal spindle cells.・Diagnostic cytopathology・あり・47(7):665-669・2019/06 ・Okano K, Arimoto T, Ishida M, Sandoh K, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K.・Collagenous crystalloids in pleomorphic adenoma of the parotid gland.・Diagnostic cytopathology・あり・47(6):612-613・2019/06 ・Okano K, Ishida M, Sandoh K, Mizokami T, Kita M, Okada H, Tsuta K.・Cytological features of uterine carcinosarcoma: A retrospective study of 20 cases with an emphasis on the usefulness of endometrial cytology.・Diagnostic cytopathology・あり・47(6):547-552・2019/06 ・Ebisu Y, Ishida M, Okano K, Sandoh K, Mizokami T, Kita M, Okada H, Tsuta K.・Small-cell neuroendocrine carcinoma in directly sampled endometrial cytology: A monocentric retrospective study of six cases.・Diagnostic cytopathology・あり・47(12):1297-1301・2019/12 ・Ishida M, Mizumoto A, Yonemura Y, Kashu I, Takemura S, Tsuta K.・Prognostic significance of the presence of epithelial cell clusters in the ascites of patients with pseudomyxoma peritonei.・Diagnostic cytopathology・あり・47(10):1024-1027・2019/10 ・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・74(5):709-717・2019/04 ・Yoshida T, Ohe C, Tsuzuki T, Sugi M, Kinoshita H, Tsuta K, Matsuda T.・Clinical impact of segmental renal vein invasion on recurrence in patients with clinical T1 renal cell carcinoma undergoing partial nephrectomy.・International journal of clinical oncology・あり・25(3):464-471・2020/03 ・Ueda N, Oe K, Nakamura T, Tsuta K, Iida H, Saito T.・Sonication of Extracted Implants Improves Microbial Detection in Patients With Orthopedic Implant-Associated Infections.・The Journal of arthroplasty・あり・34(6):1189-1196・2019/06 ・Hashimoto Y, Ishida M, Ryota H, Yamamoto T, Kosaka H, Hirooka S, Yamaki S, Kotsuka M, Matsui Y, Yanagimoto H, Tsuta K, Satoi S.・Adipophilin expression is an indicator of poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma: An immunohistochemical analysis.・Pancreatology・あり・19(3):443-448・2019/04 ・良田大典, 石田光明, 里井壮平, 薦 幸治・Follicular pancreatitis の臨床病理学的検討・関西医科大学雑誌・あり・71:15-19・2020/04 ・Ohsugi H, Yoshida T, Ohe C, Ikeda J, Sugi M, Kinoshita H, Tsuta K, Matsuda T.・The SSPN Score, a Novel Scoring System Incorporating PBRM1 Expression, Predicts Postoperative Recurrence for Patients with Non-metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma・Annals of surgical oncology・あり・28:2359-2366・2020/09 ・Yoshikawa K, Ishida M, Yanai H, Tsuta K, Sekimoto M, Sugie T.・Prognostic significance of PD-L1-positive cancer-associated fibroblasts in patients with triple-negative breast			

cancer. ・BMC cancer ・あり ・21(1):239 ・2021/03

・Kobayashi T, Ishida M, Miki H, Matsumi Y, Fukui T, Hamada M, Tsuta K, Sekimoto M. ・p62 is a useful predictive marker for tumour regression after chemoradiation therapy in patients with advanced rectal cancer: An immunohistochemical study. ・Colorectal disease ・あり ・23(5):1083-1090 ・2021/03

・Saito T, Tsuta K, Honda O, Ishida M, Yamaka R, Tanaka N, Ishida K, Utsumi T, Maru N, Matsui H, Taniguchi Y, Hino H, Kurata T, Murakawa T. ・Prognostic impact of mucin spread, tumor cell spread, and invasive size in invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. ・Lung Cancer ・あり ・146:50-57 ・2020/08

・Ebisu Y, Ishida M, Mizokami T, Kita M, Okada H, Tsuta K. ・Immunohistochemical analysis of SOX2 expression in small-cell neuroendocrine carcinoma of the endometrium ・Molecular and clinical oncology ・あり ・13(2):115-118 ・2020/08

・Yanai H, Yoshikawa K, Ishida M, Tsuta K, Sekimoto M, Sugie T. ・Presence of myxoid stromal change and fibrotic focus in pathological examination are prognostic factors of triple-negative breast cancer: Results from a retrospective single-center study. ・PLOS ONE ・あり ・16(2):e0245725 ・2021/02

・Yoshikawa K, Ishida M, Yanai H, Tsuta K, Sekimoto M, Sugie T. ・Adipophilin expression is an independent marker for poor prognosis of patients with triple-negative breast cancer: An immunohistochemical study. ・PLOS ONE ・あり ・15(11):e0242563 ・2020/11

・Hashimoto D, Satoi S, Ishida M, Nakagawa K, Kotsuka M, Takagi T, Ryota H, Terai T, Sakaguchi T, Nagai M, Yamaki S, Akahori T, Yamamoto T, Sekimoto M, Sho M. ・Does direct invasion of peripancreatic lymph nodes impact survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma? A retrospective dual-center study. ・Pancreatology ・あり ・S1424-3903(21):00102-2 ・2021/03

・Ikeda J, Ohe C, Yoshida T, Kuroda N, Saito R, Kinoshita H, Tsuta K, Matsuda T. ・Comprehensive pathological assessment of histological subtypes, molecular subtypes based on immunohistochemistry, and tumor-associated immune cell ・Pathol Int. ・あり ・71(3):173-182 ・2021/03

・Taniguchi Y, Ishida M, Saito T, Ryota H, Utsumi T, Maru N, Matsui H, Hino H, Tsuta K, Murakawa T. ・Preferentially expressed antigen in melanoma as a novel diagnostic marker differentiating thymic squamous cell carcinoma from thymoma ・Scientific reports ・あり ・10(1):1-8 ・2020/07

・Yoshikawa K, Ishida M, Kan N, Yanai H, Tsuta K, Sekimoto M, Sugie T. ・Direct comparison of magnetic resonance imaging and pathological shrinkage patterns of triple-negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy ・World journal of surgical oncology ・あり ・18(1):177 ・2020/07

<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)
・石田光明、良田大典、山本智久、山木 壮、橋本大輔、坂口達馬、里井壮平・膵内分泌腫瘍における adipophilin の発現の検討・第 51 回日本膵臓学会・web・2021/01

・吉田 崇、大江 知里、池田 純一、谷口 久哲、大杉 治之、杉 素彦、木下 秀文、松田 公志・日本人における淡明腎細胞癌に対する ClearCode34 Molecular subtypes の有用性・第 6 回日本泌尿器腫瘍学会学術集会・京都・2020/10/24

・池田 純一、大江 知里、吉田 崇、大杉治之、杉 素彦、木下 秀文、蔦 幸治、松田 公志・腎細胞癌における PD-L1 (clone 73-10) の発現と予後予測の検討・第 58 回癌治療学会学術集会・京都・2020/10/22

・吉川勝広、石田光明、菅 直木、矢内洋次、蔦 幸治、関本貢嗣、杉江智知・トリプルネガティブ乳癌における術前化学療法後の MRI と病理学的収縮パターンの比較検討・第 28 回日本乳癌学会・web・2020/10

・谷口洋平、石田光明、齊藤朋人、良田大典、内海貴博、丸 夏未、松井浩史、日野春秋、蔦 幸

治、村川知弘・新たな胸腺扁平上皮癌特異的マーカーPRAME の有用性・第 37 回日本呼吸器外科学会・Web 開催・2020/09/29

・坂口達馬、石田光明、橋本大輔、山本智久、山木 壮、廣岡 智、里井壮平、関本貢嗣・十二指腸(非乳頭部)癌の臨床病理学的検討・第 47 回日本膵切研究会・web・2020/08

・吉川勝広、石田光明、大江知里、宮坂知佳、田中顕之、石田佳央理、植村芳子、関本貢嗣、杉江知治、薦 幸治・Triple negative breast cancer における adipophilin の発現と予後についての検討・第 109 回日本病理学会総会・web・2020/04

・石田光明、谷口洋平、齊藤朋人、村川知弘、薦 幸治・PRAME は胸腺扁平上皮癌特異的マーカーである・第 109 回日本病理学会総会・web・2020/04

・大窪麻由佳、望月駿佑、石田光明、小林壽範、宮坂知佳、濱田 円、関本貢嗣、薦 幸治・大腸・直腸癌における adipophilin の発現の検討・第 109 回日本病理学会総会・web・2020/04

・望月駿佑、大窪麻由佳、石田光明、宮坂知佳、山木 壮、山本智久、里井壮平、関本貢嗣、薦幸治・膵内分泌腫瘍における adipophilin の発現の検討・第 109 回日本病理学会総会・web・2020/04

・Yoshikawa K, Ishida M, Yanai H, Tsuta K, Sekimoto M, Sugie T・Adipophilin expression as an independent marker for poor prognosis of patients with triple-negative breast cancer.・2020 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting・web・2020/06

・谷口洋平・石田光明・齊藤朋人・内海貴博・丸夏未・松井浩史・日野春秋・薦幸治・村川知弘・新たな胸腺扁平上皮癌特異的マーカーPRAME の有用性・胸腺研究会・札幌・2020/02/15

・谷口洋平、石田光明、齊藤朋人、内海貴博、丸夏未、松井浩史、日野春秋、薦幸治、村川知弘・新たな胸腺扁平上皮癌特異的マーカーPRAME の有用性と臨床応用に向けて・第 60 回日本肺癌学会・大阪・2019/12/07

・石田光明、薦 幸治・膵癌細胞における adipophilin の発現は独立した予後不良因子である・第 66 回日本臨床検査医学会学術集会・岡山・2019/11/23

・石田光明、橋本祐希、良田大典、山木 壮、里井壮平、薦 幸治・膵癌における adipophilin の発現は予後不良因子である・第 108 回日本病理学会総会・東京・2019/05/10

・橋本祐希、石田光明、良田大典、山本智久、小坂 久、廣岡 智、山木 壮、小塚雅也、松井陽一、柳本泰明、薦 幸治、里井壮平・膵癌における Adipophilin の発現は独立した予後不良因子である・第 119 回日本外科学会定期学術集会・大阪・2019/04/20

・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、薦 幸治、里井壮平・膵癌における minor component としての浸潤性微小乳頭癌の予後および PKCzeta を用いた免疫染色の有用性に関する検討・第 119 回日本外科学会定期学術集会・大阪・2019/04/18

・Ryota H, Ishida M, Satoi S, 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.・50th anniversary meeting of American pancreatic association/Japan pancreas society.・Maui, USA・2019/11/17

・Hashimoto Y, Ishida M, Ryota H, Yamamoto T, Kosaka H, Hirooka S, Yamaki S, Kotsuka M, Matsui Y, Yanagimoto H, Tsuta K, Satoi S・Adipophilin expression is an indicator of poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma: an immunohistochemical analysis.・50th anniversary meeting of American pancreatic association/Japan pancreas society.・MAUI, USA・2019/11/06

・谷口洋平・石田光明・齊藤朋人・内海貴博・丸夏未・松井浩史・日野春秋・薦幸治・村川知弘・Cancer/testis antigen PRAME is a useful diagnostic marker and potential target for antigen-specific immunotherapy for thymic squamous cell carcinoma・10th International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting (ITMIG 2019)・Niagara-on-the-Lake, Ontario, Canada・2019/10/12

・Taniguchi Y, Ishida M, Saito T, Ryota H, Utsumi T, Maru N, Matsui H, Hino H, Tsuta K, Murakawa T・Cancer/testis antigen PRAME is a useful diagnostic marker and potential target for antigen-specific immunotherapy for thymic squamous cell・10th International Thymic Malignancy Interest Group Annual Meeting (ITMIG 2019)・Niagara-on-the-Lake, Ontario, Canada・2019/10

＜特許申請・取得状況＞
該当なし

3. 代謝部門

薬理学講座	
iPS・幹細胞再生医学講座	
衛生・公衆衛生学講座	
法医学講座	
侵襲反応制御部門	
生体情報部門	
ゲノム編集部門	
内科学第二講座	
外科学講座	
形成外科学講座	
眼科学講座	
物理学教室	

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	弾性線維、架橋構造、Fibulin-4、LOX		
講座内の本プロジェクト参加研究者数	3 名		
研究組織（本プロジェクトに参加する研究者、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）遺伝子変異マウスの作成 村部知里（技師）実験補助			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）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群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。 フィブリン 4(Fibulin-4)と呼ばれる細胞外マトリックスタンパク質の遺伝子変異マウスはコラーゲン線維や弾性線維の形成が不完全であり大動脈や横隔膜の断裂により新生仔致死の表現型を示す。このことからフィブリン 4 は線維形成やその成熟化に重要な役割を担っていることが考えられているが、その機能的役割は完全に解明されていない。コラーゲン線維や弾性線維の成熟化には lysyl oxidase (LOX) によるタンパク質間の架橋構造形成が必須であり、本研究にて我々は活性型 LOX の形成にフィブリン 4 が関わっていることを明らかにした。 フィブリン 4 欠損マウスの胎児線維芽細胞(MEF)から分泌される LOX は正常マウスの MEF から分泌される LOX に比べ SDS-PAGE での移動度が小さく、その架橋活性も著しく減弱していたことからフィブリン 4 の欠損は LOX の構造に何らかの影響を与えることが示唆された。LOX の活性中心には LTQ と呼ばれ酵素活性発現に必須である特殊な分子内架橋構造が形成されるが、質量分析による解析によりフィブリン 4 欠損マウスの MEF から得られた LOX にはその構造が形成されていないことがわかった。LOX 内の LTQ はコファクターとして分子内に配位した銅イオンにより形成されることが知られており、細胞内で LOX に銅イオンを受け渡すのは ATP7A と呼ばれる膜タンパク質であることがわかっている。我々は ATP7A 遺伝子に変異の入った MEF から分泌された LOX を調べ、フィブリン 4 欠損 MEF に由来する LOX と同様に SDS-PAGE での移動度が小さくなっていることを確認した。またフィブリン 4 欠損マウス MEF 由来の LOX は銅イオンの含有量が激減していたことから、フィブリン 4 の機能は LOX への銅イオンの供与に関係することが示唆された。そこで組換え体フィブリン 4 と ATP7A との結合を調べたところ、両タンパク質は会合体を形成することがわかり、さらにはフィブリン 4 欠損 MEF の培養液に組換え体フィブリン 4 を添加することで活性のある LOX が形成されることが明らかとなった。これらの結果から、フィブリン 4 は細胞内で合成されて ATP7A の局在するゴルジ装置に移行、あるいは細胞外から細胞内に取り込まれてゴルジ装置に移行し、そこで ATP7A によってゴルジ装置内に取り込まれる銅イオンを LOX に受け渡す機能があることを証明した。 本研究はコラーゲン線維や弾性線維の成熟化に必須である架橋酵素 LOX の活性化にフィブリン 4 が深く関わっていることを報告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ステップの完全解明に向けてさらに一歩前進したといえる。			

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) - Jiang, L., Jung, S., Zhao, J., Kasinath, V., Ichimura, T., Joseph, J., Fiorina, P., Liss, A.S., Shah, K., Annabi, N., Joshi, N., <u>Akama, T.O.</u>, Bromberg, J.S., Kobayashi, M., Uchimura, K., Abdi, R., Simultaneous targeting of primary tumor, draining lymph node, and distant metastases through high endothelial venule-targeted delivery. Nano Today (査読有り) Feb;36:101045 (2021) doi: 10.1016/j.nantod.2020.101045. Epub 2020 Dec 14. PMID: 33391389 - Nonaka, M., Mabashi-Asazuma, H., Jarvis, D.L., Yamasaki, K., <u>Akama, T.O.</u>, Nagaoka, M., Sasai, T., Kimura-Takagi, I., Suwa, Y., Yaegashi, T., Huang, C.T., Nishizawa-Harada, C., Fukuda, M.N., Development of an orally-administrable tumor vasculature-targeting therapeutic using annexin A1-binding D-peptides. PLoS One (査読有り) 6;16(1):e0241157 (2021) doi: 10.1371/journal.pone.0241157. eCollection 2021. PMID: 33406123 - Noda K, Kitagawa K, Miki T, Horiguchi M, <u>Akama T.O.</u>, Taniguchi T, Taniguchi H, Takahashi K, Ogra Y, Mecham RP, Terajima M, Yamauchi Y, <u>Nakamura T</u>: A matricellular protein fibulin-4 is essential for the activation of lysyl oxidase. Sci Adv 6(48):eabc1404, 2020. doi: 10.1126/sciadv.abc1404. - Kinoshita Y, Ikeda T, Kushima H, Fujita M, <u>Nakamura T</u>, Nabeshima K, Ishii H: Serum latent transforming growth factor-β binding protein 4 as a novel biomarker for idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis. Respir Med (査読有り) 171:106077, 2020. doi: 10.1016/j.rmed.2020.106077. - Suzuki, K., Iwai, H., Utsunomiya, K., Kono, Y., Kobayashi, Y., Van Bui, D., Sawada, S., Yun, Y., Mitani, A., Kondo, N., Katano, T., Tanigawa, N., <u>Akama, T.</u>, Kanda, A., Combination therapy with lenvatinib and radiation significantly inhibits thyroid cancer growth by uptake of tyrosine kinase inhibitor. Exp. Cell Res. (査読有り) 398(1):112390 (2021) doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112390. Epub 2020 Nov 21. PMID: 33227314 - Koyama S, Horie T, Nishino T, Baba O, Sowa N, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Xu S, Yamasaki T, Otani C, Watanabe T, <u>Nakamura T</u>, Hasegawa K, Kimura T, Ono K. Identification of Differential Roles of MicroRNA-33a and -33b During Atherosclerosis Progression With Genetically Modified Mice. J Am Heart Assoc (査読有り) 8(13):e012609, 2019. doi: 10.1161/JAHA.119.012609. - Narentuya, Takeda-Uchimura, Y., Foyez, T., Zhang, Z., Akama, T.O., 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. (査読有り) 9, 4387 (2019) doi:10.1038/s41598-019-40901-2 - Tsutsumiuchi, M., Hoshino, H., Kogami, A., Tsutsumiuchi, T., Yokoyama, O., <u>Akama, T.O.</u>, Motohiro Kobayashi, M., Preferential expression of sialyl 6'-sulfo N-acetylglucosamine-capped O-glycans on high endothelial venules in human peripheral lymph nodes. Lab. Invest. (査読有り) 99, 1428-1441 (2019) - Nonaka, M., Suzuki-Anekoji, M., Nakayama, J., Mabashi-Asazuma, H., Jarvis, D.L., Yeh, J.C., Yamasaki, K., <u>Akama, T.O.</u>, Huang, C.T., Campos, A.R., Nagaoka, M., Sasai, T., Kimura-Takagi, I., Suwa, Y., Yaegashi, T., Shibata, T.K., Sugihara, K., Nishizawa-Harada, C., Fukuda, M., Fukuda, M.N., Overcoming the blood-brain barrier by Annexin A1-binding peptide to target brain tumours. Br. J. Cancer. (査読有り) 123(11):1633-1643 (2020) doi: 10.1038/s41416-020-01066-2. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32921792 - 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 (査読有り) 257(2):289-301, 2019. doi: 10.1007/s00417-018-4184-5. <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) <u>Nakamura, T.</u>: Essential function of Fibulin-4 in lysyl oxidase activation. Invited talk at Gordon Research Conference on Elastin, Elastic Fibers, and Microfibrils (July 21 – July 25, 2019, Manchester, NH, U.S.A.).			

(国内学会)

1. 中邨智之：「循環器病学基礎研究の歴史をたどる ～ 生理学から分子生物学へ～」第 84 回日本循環器学会学術集会 会長特別企画 基礎研究のすすめ（オンライン、2020 年 7 月 30 日）
2. 中邨智之：「弾性線維形成のしくみ ～弾性線維形成タンパク質と日光弾性線維症の発症メカニズム」第 41 回日本光医学・光生物学会 招待講演（ホテルグランテラス富山、富山、2019 年 7 月 19 日）
3. 赤間智也、星野瞳、中邨智之、小林基弘：「新規硫酸化糖鎖抗体の作製」第 92 回日本生化学会大会 ポスター発表（パシフィコ横浜、2019 年 9 月 18 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	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） 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）、 松岡由和（助教）、山下裕美（助教）：実験計画の立案及び実施			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） ヒト iPS 細胞を用い、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・免疫系細胞の再生医療研究を行った。 1) iPS 細胞による内分泌領域再生医療の実現 腎性貧血に対する新規細胞療法の開発 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た。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た。そこでヒト 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、エリスロポエチンを生理的に補充する研究を行った。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している。ヒト 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、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。 腎性骨異常栄養症に対する新規細胞療法の開発 慢性腎不全に合併する腎性骨異常栄養症に対して、iPS 細胞を用いた研究を行った。腎機能が低下すると、カルシウムおよびリンの代謝異常、活性型ビタミン D 欠乏に伴って、様々な骨病変を呈する。iPS 細胞から独自の方法で誘導した副甲状腺ホルモン産生細胞を用い、腎性骨異常栄養症の病態解明と新規治療法を開発を行った。また骨粗鬆症に対して副甲状腺ホルモンが臨床で使用されており、iPS 細胞由来副甲状腺細胞の臨床応用に向けた研究を行った。 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 エリスロポエチン産生細胞や副甲状腺ホルモン産生細胞以外に、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た。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、少ない細胞数で機能することができ、評価系が確立していることがあげられる。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い、さらに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た。 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と、臨床応用で必要とされる技術革新の研究を行った。心臓領域における臨床応用として、iPS 細胞由来心筋細胞を用いた重度心不全治療法や、再生医療技術を用いた心房細動治療法を開発している。基盤技術の開発研究として、再生医療全般に応用できる安全性向上方法の開発やナノメディスンの研究をしており、さらに基礎研究の充実として、心臓の創傷治癒反応の網羅的解析を行った。これらの研究プロジェクトを列記する。 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 6. iPS 細胞の多種組織分化、創薬・健康促進分野への Translation 7. AI を搭載した次世代多能性幹細胞自動培養装置の開発 8. モノクローナル抗体を用いる心房梗塞の臨床検査法の開発			

9. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた、新型コロナウイルス感染に関する研究

3) iPS 細胞による造血系・免疫系の再構築および疾患病態解明と新規治療法開発

ヒト iPS 細胞由来造血幹細胞の分化誘導法を開発した。さらに制御性 T 細胞の再生を目指し研究を行った。これらの研究成果を用いた病態モデル作製や、疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態の再現により、免疫疾患や白血病の病態解明と新規治療法の開発をしている。制御性 T 細胞に関する研究成果を列記する。

1. iPS 細胞の樹立：末梢血中のポリクローナルな T 細胞を材料として iPS 細胞を安定して樹立する手技を取得した。
2. T 細胞誘導に用いる feeder 細胞の作製：ヒト iPS 細胞から T 細胞系への誘導には feeder 細胞として OP9 細胞、及び OP9 細胞に DLL-1 あるいは DLL-4 を強制発現させた細胞株が用いられる。DLL-4 高発現 OP9 細胞株が入手困難であるため、当講座では DLL-4 高発現 OP9 細胞株を作製した。
3. Tet-On システムによる制御性 T 細胞作成遺伝子発現ベクターの作製：ヒト iPS 細胞から制御性 T 細胞を誘導する過程で必要なベクターを作製した。

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> (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>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 15:459-461, 2019. レフェリー有 2. <u>Yamashita H</u>, Fukuda K, <u>Hattori F</u>. Hepatocyte-like cells derived from human pluripotents stem cells can be enriched by combination of mitochondorial content and activated leukocyte cell adhesion molecule. JMA Journal 2:174-183, 2019. レフェリー有 3. <u>角出 啓輔</u>, <u>松岡 由和</u>, <u>藺田 精昭</u> ヒト臍帯血由来 CD34 抗原陰性造血幹細胞の 1 細胞解析から見た新たなヒト造血幹細胞の階層制 関西医科大学雑誌 70:1-8, 2019. レフェリー有 4. Yamazaki D, Konishi Y, Morikawa T, Kobara H, Masaki T, <u>Hitomi H</u>, Osafune K, Nakano D, Kittikuluth W, Nishiyama A. Failure to confirm an SGLT2 inhibitor-induced hematopoietic effect in non-diabetic rats with renal anemia. J Diabetes Investig 11:834-43, 2020. レフェリー有 5. Nishimoto S, Mizuno T, Takahashi K, Nagano F, Yuzawa Y, Nishiyama A, Osafune K, <u>Hitomi H</u>, Nagamatsu T. CD140b and CD73 are markers for human induced pluripotent stem cell-derived erythropoietin-producing cells. FEBS Open Bio 10:427-33, 2020. レフェリー有 6. Mashima H, Zhang R, Kobayashi T, Hagiya Y, Tsukamoto H, Liu T, Iwama T, Yamamoto M, Lin C, <u>Nakatsuka R</u>, Mishima Y, Watanabe N, Yamada T, Senju S, Kaneko S, Idiris A, Nakatsura T, Ohdan H, Uemura Y. Generation of GM-CSF-producing antigen-presenting cells that induce a cytotoxic T cell-mediated antitumor response. Oncoimmunology 9:1814620, 2020. レフェリー有 7. Katagiri N, <u>Hitomi H</u>, Mae S, Kotaka M, Lei L, Yamamoto T, Nishiyama A, Osafune K. Retinoic acid regulates erythropoietin production cooperatively with hypoxia-inducible factors in human iPSC-derived erythropoietin-producing cells. Scientific reports 11:3936, 2021. レフェリー有 8. <u>松岡由和</u> イメージサイトメトリーと機械学習による明視野像を用いた細胞の自動判別 Cytometry Research 30:15-19, 2020. レフェリー有 9. <u>人見 浩史</u> 間質の間質細胞・血管構成細胞 腎臓の間質細胞・血管構成細胞の臨床 腎と透析 89:408-412, 2020. レフェリー無 10. <u>人見 浩史</u> 腎性貧血新規治療 腎臓内科 12:304-309, 2020. レフェリー無 <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>松岡 由和</u>, <u>中塚 隆介</u>, <u>藤岡 龍哉</u>, <u>藺田 精昭</u> イメージサイトメトリーと機械学習による明視野像を用いた細胞の自動判別 第 29 回日本サイトメトリー学会学術集会 東京都 2019 年 5 月 2. <u>人見 浩史</u> 腎疾患における iPS 細胞の臨床応用 第 54 回日本小児腎臓病学会学術集会 大阪市 2019 年 6 月 3. <u>人見 浩史</u> iPS 細胞を用いた腎性貧血および内分泌疾患治療の展望 第 64 回日本透析医学会学術集会 横浜市 2019 年 6 月 4. <u>松岡 由和</u>, <u>藤岡 龍哉</u> ヒト CD34 抗原は SCID-repopulating cell の生着に必須ではない 第 81 回日本血液学会学術集会 東京都 2019 年 10 月 5. <u>人見 浩史</u> iPS 細胞を用いた内分泌細胞の分化誘導と治療の展望 第 30 回日本サイトメトリー学会学術集会 誌上発表 2020 年 5 月 6. <u>人見 浩史</u> iPS 細胞を用いた腎臓病における臨床応用と研究の展望 第 57 回近畿小児腎臓病研究会 枚方市 2021 年 3 月 <特許申請・取得状況> 1. 発明の名称：副甲状腺細胞の作製方法 特許出願番号：2019-199409			

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	代謝部門		
分担研究課題	感染症の新規診断法の開発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	結核、バイオマーカー、miRNA、骨粗鬆症、破骨細胞、漢方製剤		
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） 西山利正 教授 研究の統括 神田靖士 准教授 感染症診断に有用な新規バイオマーカーの探索 下埜敬紀 助教 次世代シーケンサーによる遺伝子解析 村上由希 助教 骨粗鬆症モデルマウスの作製と治療効果の評価 ペーオペット・ラーマニーガオ 研究員 寄生虫感染症の診断法の開発 方 軻 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			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） <u>更年期障害に対して処方される漢方製剤の骨粗鬆症に対する治療メカニズムの解明</u> 破骨前駆細胞である RAW264 細胞に対して破骨細胞分化因子 sRANKL を添加すると同時に種々の漢方薬（300 μg/ml）または PBS（対照）を添加し、1、3、5 日目において破骨細胞分化過程における影響を TRAP 染色並びに破骨細胞分化マーカーを用いた遺伝子レベルでの解析を行った。 〔結果〕 sRANKL 添加後 3 日目と 5 日目において、漢方薬添加群は対照群と比較して TRAP 活性および TRAP 陽性の単核破骨細胞数および多核破骨細胞数が有意に減少した。特に温経湯と加味逍遙散は成熟破骨細胞への分化抑制効果が顕著であった。遺伝子レベルでの解析では、温経湯、加味逍遙散、人參養榮湯は破骨細胞分化の主要な転写因子である NFATc1 の遺伝子発現量を有意に減少させた。また処方薬添加群では、RANKL-RANK シグナルの下流にある NF-κB シグナル（canonical pathway）と p38 MAPK シグナルに関与する遺伝子群の発現が有意に減少した。さらに、最も破骨細胞分化抑制効果のあった温経湯の添加により、NFATc1 を抑制する転写抑制因子 Bcl6（B cell lymphoma 6）の発現が有意に増加した。本研究により、温経湯と加味逍遙散は破骨細胞の分化過程において抑制作用を示すことが示唆された。 <u>新規バイオマーカーを使用した活動性結核の診断法の開発</u> ラオス人民民主共和国カムワン県の保健局の協力の下、活動性結核患者（N=10）と健常者（N=3）から採取した尿を用いて、miRNA を特異的に結合する磁性ビーズを用いて抽出した miRNA の発現を次世代シーケンサーにて網羅的解析を行った。その結果、健常者と活動性結核患者の比較から、発現変動した miRNA を特定し、数種の miRNA において健常者と活動性結核患者との間に有意差が認められた。更にこれらの miRNA に対して特異的プライマーを作製し、Realtime PCR により定量的解析を行った。その結果、一部の miRNA について健常者と活動性結核患者の比較を行った結果、健常者と比較して結核患者は発現頻度が有意に高く、更に HIV 陽性患者は結核患者の中でも高い傾向にあることが分かった。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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. Hayashi I, <u>Kanda S</u>, <u>Lamaningao P</u>, Mishima N, <u>Nishiyama T</u>. Shared expression of mucin12 in <i>Ascaris lumbricoides</i> and the human small intestine. Mol Biochem Parasitol. 227:19-24 2019 2. Andrew Waleluma Darcy, <u>Kanda S</u>, Tenneth Dalipanda, Cynthia Joshua, <u>Shimono T</u>, <u>Pheophet Lamaningao</u>, Mishima N , <u>Nishiyama T</u> Multiple arboviral infections during a DENV-2 outbreak in Solomon Islands Tropical Medicine and Health 48(33)2020 3. <u>Pheophet Lamaningao</u>, <u>Kanda S</u>, <u>Shimono T</u>, Somchit Inthavongsack, Thonelakhanh Xaypangna, Nishiyama T. Aedes mosquito surveillance and the use of a larvicide for vector control in a rural area of the Lao People' s Democratic Republic. Tropical Medicine and Health 48(54)2020 <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>Pheophet Lamaningao</u>, <u>Seiji Kanda</u>, <u>Takaki Shimono</u>, Somchit Inthavongsack, Thonelakhanh Xaypangna, and <u>Toshimasa Nishiyama</u> <i>Aedes</i> genus mosquitos surveillance in vector control activity in rural communities in Thakhek district, Khammouane province, Lao PDR. 13th National Health Research Forum, Laos. 2019 年 10 月 2. <u>下埜敬紀</u>, <u>神田靖士</u>, <u>Pheophet Lamaningao</u>, Andrew Darcy, <u>西山利正</u> Phenotypic and genotypic profile of insecticides resistance in populations of mosquitos <i>Aedes</i> spp., from Lao P.D.R 第 60 回日本熱帯医学会大会 2019 年 11 月 3. <u>Pheophet Lamaningao</u>, <u>Seiji Kanda</u>, <u>Takaki Shimono</u>, Somchit Inthavongsack, Thonelakhanh Xaypangna, <u>Toshimasa Nishiyama</u> <i>Aedes</i> genus mosquitos surveillance in vector control activity in rural communities in Thakhek district, Khammouane province, Lao PDR 第 60 回日本熱帯医学会大会 2019 年 11 月 <特許申請・取得状況> 1. 特許第 6742773 号 検査キット及び検査方法 出願日 平成 28 年 3 月 24 日 登録日 令和 2 年 7 月 31 日 出願人 西山利正、神田靖士 本特許は感染症の診断を行う際に尿に標的物質が含まれていることを高感度に検出可能であり、 検査に要する作業を簡便且つ迅速に行うことの可能な検査キットを提供する。 2. 特願 2020-107042 結核感染の検査方法 出願日 令和 2 年 6 月 22 日 出願人 西山利正、神田靖士、下埜敬紀 次世代シーケンサーで得られた結果から結核患者で変動するmiRNAを候補として挙げた。本研 究は更に網羅的解析からこれらの候補miRNAの検証を行うと共に多検体での定量的解析から結核 感染に特異的miRNAを絞り込む。また診断キットとして製品化を行うために上記の特許第6742773 号「尿を検体とした検査法」を使用してキット化を目指す。			

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 眞鍋 翔（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（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） 2019 年 1. メチル化解析による死亡時年齢の推定 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．そこで，次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化解析による，DNA から由来人物の年齢推定を行う実証実験を行なった．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（男性 25 名，女性 15 名，年齢 0-89 歳）の DNA を試料とし，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なった．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ところ，各部位において修正済決定係数（adjR2）はかなりの幅を持って観察された．そのため，決定係数が 0.5 以上の部位を選択し，実年齢と推定年齢の相関関係を検討した結果，修正済決定係数は 0.949（標準偏差 6.04）となり，DNA からある程度は正確な年齢推定が可能であることが判明した． 2. 染色体上マーカーにおける変異解析の一例 ある DNA 型鑑定において Yfiler（Thermo Fisher Scientific）による Y-STR 解析を行ったところ，DYS385 a/b 座位にて 11, 12, 15 繰り返しの 3 本のピークが観察された．コンタミネーションの可能性が低いと思われたため，PowerPlex Y23（Promega）を用いて Y-STR 型の確認を行ったところ，同様に 11, 12, 15 型の 3 本のピークが観察された．プライマーの位置を変えても同じ結果が得られたことから，この試料は DYS385a/b 座位において 3 種の繰り返し配列を持つ変異型であると結論づけた．確認のために，次世代シーケンサーを用いた Fusion Method によるシーケンスを行ったところ，繰り返し配列である [GAAA] の 11, 12, 15 回繰り返しが確認された．3 種の繰り返し配列は確認できたが，それがどのように配置されているのか，または 11-12 と 11-15 などのように Y 染色体のモザイクなのかは不明である．それを決定するためにはより広い領域をシーケンスして確認する必要がある．			
2020 年 3. 日本人における次世代シーケンサーを用いた Y 染色体上 SNP 解析 Y 染色体は男性特有のものであり，そのマーカーは暴行・強姦事件における男性の識別に非常に有効である．また，Y 染色体は父系遺伝であることから世界レベルで見ると地域性を持つことが知られている．Y 染色体の SNP を解析することで決定される「型」を Y ハプログループ（Y haplogroup）と呼び，大きく分けて A～Z のタイプに分かれ，さらにその下流に A1, A1a のようにサブタイプが多数存在している．今回は，次世代シーケンサーを用いて男性 1 検体当たり 859SNP を解析し，日本人における詳細な Y ハプログループのデータベースを作成することが目的			

である。当教室に保管されているヒト DNA のうち 179 名の男性 DNA を選別し、試料とした。なおこの研究は当大学倫理委員会の承認を受けている(#2016704)。オランダ、ロッテルダムのエラスムスメディカルセンターに所属する Arwin Ralf 博士より提供を受けたプライマーセットを用いて、Y 染色体上に存在する 859SNP 領域を増幅した。次世代シーケンサーGeneStudio S5 System を用いてシーケンス後、Plug-in ソフトウェア(Yleaf)にて型判定を行なったところ、日本人 179 名のハプログループ解析の結果は、タイプ O (53%) が最も多く、次にタイプ D (34%) が多い結果となった。サブタイプも細かく分類することができ、計 28 種ものハプログループが同定され、個人識別に有用なデータベースを構築することができた。

4. DNA メチル化解析を中心とした心臓突然死診断への多角的アプローチ

法医実務では、剖検所見からのみでの死因判断に苦慮する事例が稀ならず存在する。このような場合”molecular autopsy”が有効ではあるが、これはあくまでもリスクファクターとして捉えられている。そこで新たな判断基準として心筋のメチル化解析を試みた。当講座にて解剖に付された突然死例のうち、3 例の乳幼児突然死例(4M 男児, 4M 女児, 20M 男児)と心筋炎 1 例(2M)、窒息 1 例(1M)、ダウン症候群 1 例(2M)、そして若年性突然死 1 例(15 歳)の 7 例に加え、比較対象として脳内出血 1 例(57 歳)の解析を行った。Molecular autopsy は Ion AmpliSeq Cardiovascular Research Panel および Ion PGM System (ThermoFisher Scientific)を用いて 404 遺伝子、10430 SNPs の解析を行った。さらにそれぞれの心筋中隔を試料として、Infinium MethylationEPIC BeadChip Kit および iSCAN system (Illumina)により全ゲノム上 86 万のメチル化サイトの解析を行い、最初の乳幼児突然死 3 例群とそれぞれ死因が異なる例との間でメチル化率の比較を行った。Molecular autopsy では、乳幼児突然死例で心臓突然死例に関連があるとされる SCN5A, KCNQ1, MYBPC3 等の遺伝子に変異がそれぞれに観察され、いずれもリスクを保持していることが判明した。さらに 3 例の乳幼児突然死例群と他の死因群での心筋のメチル化率の増減を比較したところ、心筋炎例では HLA に関連するサイトのメチル化率に違いが観察された。また、若年性例との比較ではエイジングに関連があるサイトに違いが見られ、メチル化率の変異は病理的な状況を反映しているようであった。全ての例間で ATP10A 遺伝子の変化が観察されたが、これが新たな判断基準となるためにはさらなる解析が必要である。

5. ある親子鑑定例に見られた D19S433 座位におけるサイレントアレル.

擬父、母、子の定型的なある親子鑑定例において STR 解析を行ったところ、D19S433 座位において母-子関係が否定された。互いに別なタイプのホモ型を示したのである。他の 20 STR 座位では親子関係が否定されず、ミトコンドリア DNA にも矛盾が見られなかったため、これはプライマーが付く配列に変異を持つためそのアレルが増幅されない、いわゆるサイレントアレルであろうと思われた。そこで D19S433 座位のプライマーを新たに設計・合成し、再解析を行ったところ、母、子ともにヘテロ型であることが確認され、その型は父 14, 15, 母 13, 16.2, 子 13, 14 であった。そこでサイレントアレル「13」を次世代シーケンサーGeneStudio S5 System によりシーケンスを行なった結果、Globalfiler で増幅されなかったアレル「13」は、繰り返し配列の 32 塩基下流に G>A の変異があり、この変異のためキットのプライマーが付着しなかったと思われた。

結論として、遺伝病である遺伝性痙攣性対麻痺の原因遺伝子は両親から受け継いだものではなく、*De Novo* の変異であることが確認された。

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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. C. Phillips, D. McNevin, K.K. Kidd, R. Lagacé, S. Woottone, M. de la Puentea, A. Freire-Aradasa, A. Mosquera-Miguela, M. Eduardoff, T. Grossg, L. Dagostinoh, D. Power, S. Olsons, M. Hashiyada, C. Oz, W. Parson, , P.M. Schneider, M.V. Lareua, R. Daniel. MAPlex - A massively parallel sequencing ancestry analysis multiplex for Asia-Pacific populations. Forensic Science International: Genetics 査読有 42 (2019) 213-226. 2. Masaki Hashiyada, Masahiro Obayashi, Tomohiro Matsumoto, Sumitaka Yoshimura, Atsushi Akane. Epigenome-wide association study for sudden unexpected infant death. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 査読有 Volume 7, Issue 1, December 2019, Pages 818-819 3. 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. DNA 多型, 査読有, Vol.27, 163-166, 2019. 4. Haitian Nan, Kensho Okamoto, Lihua Gao, Yuto Morishima, Yuta Ichinose, Kishin Koh , Masaki Hashiyada , Noboru Adachi and Yoshihisa Takiyama. A Japanese SPG4 Patient with a Confirmed De Novo Mutation of the SPAST Gene. Intern Med Advance Publication J 査読有 une 9, 2020; Sep 15;59(18):2311-2315. doi: 10.2169/internalmedicine.4599-20 <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. 辻章志、赤川翔平、赤川友布子、木野仁郎、山内壮作、木全貴久、橋谷田真樹、赤根敦、金子一成 . 2019/05/18. 小児特発性ネフローゼ症候群における腸内細菌叢の異常. 第 49 回京都腎免疫研究会. 京都. 2. 橋谷田真樹, 大林将弘, 松本智寛, 吉村澄孝, 赤根敦, Xueting Guan, 大内司, 舟山真人 . 2019/06/14. DNA メチル化解析による死亡時年齢の推定 -第 2 報-. 第 103 次日本法医学会学術全国集会. 仙台. 3. 赤川友布子、赤川翔平、山口正、木野仁郎、山内壮作、木全貴久、辻章志、橋谷田真樹、赤根敦、金子一成 . 2019/06. 抗菌薬による乳児期の腸内細菌叢の変化に関する経時的検討. 第 23 回 腸内細菌学会. 東京. 4. 橋谷田真樹, 大林将弘, 松本智寛, 赤根 敦. DNA メチル化解析を中心とした心臓突然死診断への多角的アプローチ. 第 104 次日本法医学会学術全国集会. 京都. 5. 橋谷田真樹, 眞鍋 翔, 大林将弘, 松本智寛, 赤根 敦. ある親子鑑定例に見られた D19S433 座位におけるサイレントアレル. 2020/11/09. 第 67 回日本法医学会学術近畿地方集会. 滋賀. <特許申請・取得状況> なし			

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（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） 1. マクロファージ活性化における代謝リプログラミングの分子機序 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、数時間以内にミトコンドリア呼吸の抑制（酸素消費量の低下）が誘導された。活性化後も細胞内 ATP レベルの大きな変動は認められなかったが、ほぼ解糖系に依存したエネルギー代謝にシフトしており、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。酸素消費速度を指標としてミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性を個別に測定したところ、活性化型マクロファージにおいても呼吸鎖複合体 II、III、IV の機能は正常に保たれており、基質の供給経路の変容がミトコンドリア呼吸抑制に関わることが示唆された。 2. ポリサルファイド（H ₂ S _n ）が細胞機能に与える影響の探究 硫化水素（H ₂ S）は、神経伝達調節、血管弛緩、酸化ストレスからの細胞保護、抗炎症など様々な作用を持つシグナル分子として機能している。しかし、その作用メカニズムの詳細は未だ解明されていなかった。新規シグナル分子として最近注目を集めているポリサルファイド（H ₂ S _n ）が生体内で H ₂ S から酸化反応により生成されることが示され H ₂ S の作用の一部を担っているという報告も存在する。本研究室では従来の H ₂ S を用いた研究を発展させ H ₂ S _n の低酸素誘導性遺伝子発現に対する作用、グルコース依存性インスリン分泌に及ぼす影響について検討してきた。H ₂ S _n がミトコンドリアを標的として生体内の低酸素感知機構を攪乱することにより低酸素誘導性の転写因子 HIF の活性化を阻害すること、また H ₂ S _n が KATP チャネルを開口させることによりグルコース依存性インスリン分泌を抑制する事を見いだした。この研究との関連で静脈麻酔薬プロポフォールが Kv2.1 チャネルへの影響を介してインスリン分泌を更新するという事実を見いだした。 3. 喫煙による子宮内膜での低酸素誘導性因子の活性化の探究 喫煙（CS）は、癌を含む多くの致死性の障害の発生に寄与する主要な要因である。また、喫煙や受動喫煙は妊娠の成立や維持にも影響を及ぼすが、ヒトの子宮内膜に及ぼす喫煙の影響については、いまだ十分に理解されていない。私たちはヒト初代子宮内膜間質細胞と不死化細胞株（KC02-44D）を用いて、CS 誘導性低酸素誘導因子（HIF）-1 α 活性化の制御機構を検討した。その結果、CS 抽出物（CSE）は子宮内膜間質細胞において活性酸素種レベルを上昇させ、HIF-1 α タンパク質の安定化を促進すること、また、低酸素環境下では濃度および時間に依存して HIF-1 α 依存性の遺伝子発現を誘導することを明らかにした。さらに、低酸素環境下でも、CSE 処理後に低酸素誘導遺伝子の発現が上昇することを明らかにした。これらの結果から、HIF-1 α は CSE による細胞ストレス、炎症、子宮内膜リモデリングに重要な役割を果たしている可能性が示唆された。			

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. <u>T. Shoji</u>, M. Hayashi, C. Sumi, <u>M. Kusunoki</u>, <u>T. Uba</u>, <u>Y. Matsuo</u>, H. Kimura, <u>K. Hirota</u>, Pharmacological polysulfide suppresses glucose-stimulated insulin secretion in an ATP-sensitive potassium channel-dependent manner, Sci Rep 9 (2019) 19377. 10.1038/s41598-019-55848-7. 査読有 2. <u>M. Kusunoki</u>, M. Hayashi, <u>T. Shoji</u>, <u>T. Uba</u>, H. Tanaka, C. Sumi, <u>Y. Matsuo</u>, <u>K. Hirota</u>, Propofol inhibits stromatoxin-1-sensitive voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta-cells and enhances insulin secretion, PeerJ 7 (2019) e8157. 10.7717/peerj.8157. 査読有 3. C. Sumi, <u>Y. Matsuo</u>, <u>M. Kusunoki</u>, <u>T. Shoji</u>, <u>T. Uba</u>, T. Iwai, H. Bono, <u>K. Hirota</u>, Cancerous phenotypes associated with hypoxia-inducible factors are not influenced by the volatile anesthetic isoflurane in renal cell carcinoma, PLoS ONE 14 (2019) e0215072. 10.1371/journal.pone.0215072. 査読有 4. <u>K. Hirota</u>, An intimate crosstalk between iron homeostasis and oxygen metabolism regulated by the hypoxia-inducible factors (HIFs), Free Radic Biol Med 133 (2019) 118-129. 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.018. 査読有 5. <u>K. Hirota</u>, Basic Biology of Hypoxic Responses Mediated by the Transcription Factor HIFs and its Implication for Medicine, Biomedicines 8 (2020) E32. 10.3390/biomedicines8020032. 査読有 6. M. Kakita-Kobayashi, H. Murata, A. Nishigaki, Y. Hashimoto, S. Komiya, H. Tsubokura, T. Kido, N. Kida, T. Tsuzuki-Nakao, <u>Y. Matsuo</u>, H. Bono, <u>K. Hirota</u>, H. Okada, Thyroid Hormone Facilitates in vitro Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells via Thyroid Hormone Receptors, Endocrinology 161 (2020). 10.1210/endo/bqaa049. 査読有 7. N. Kida, <u>Y. Matsuo</u>, Y. Hashimoto, K. Nishi, T. Tsuzuki-Nakao, H. Bono, T. Maruyama, <u>K. Hirota</u> and H. Okada, Cigarette smoke extract activates hypoxia-inducible factors in a reactive oxygen species-dependent manner in stroma cells from human endometrium. Antioxidants (Basel) 10: 48 (2021) 査読有 8. <u>広田 喜一</u>, ミトコンドリアの酸素代謝異常と疾患, 医学のあゆみ 274 (2020) 248-252. 査読無 9. <u>広田 喜一</u>, 局所麻酔薬／プロポフォールとミトコンドリア障害：HIF-1 活性化による障害軽減の可能性, Anet 24 (2020) 15-19. 査読無 <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. 角 千里, 岡本 明久, <u>楠 宗矩</u>, <u>正司 智洋</u>, <u>右馬 猛生</u>, <u>広田 喜一</u> プロポフォールはミトコンドリアの電子伝達系を介して代謝を解糖系にシフトさせ細胞死を誘導する 日本麻酔科学会第 66 回学術集会 神戸市 2019 年 5 月 30 日 2. <u>広田 喜一</u> 低酸素-低酸素誘導性因子(HIF)-炎症 第 72 回日本酸化ストレス学会学術集会 札幌市 2019 年 6 月 27 日 3. <u>広田 喜一</u> Hypoxia and Beyond:HIF-1 から炎症・肺傷害へ 第 230 回 原医研セミナー 広島大学原爆放射線医科学研究所 広島市 2019 年 11 月 17 日 4. 松尾 禎之, <u>広田 喜一</u> マクロファージ活性化における代謝リプログラミングの分子機序 第 42 回日本分子生物学会年会 福岡市 2019 年 12 月 5 日 5. <u>正司 智洋</u>, <u>楠 宗矩</u>, <u>右馬 猛生</u>, 角 千里, 林 美樹夫, <u>広田 喜一</u> セボフルランが膠芽腫幹細胞の sphere 形成能, 増殖能へ及ぼす影響の検討 日本麻酔科学会第 67 回学術集会 Web 開催 2020 年 6 月 4 日 6. <u>楠 宗矩</u>, <u>広田喜一</u>, <u>右馬猛生</u>, <u>正司智洋</u>, 福田尚代, <u>松尾禎之</u> デクスメトミジンは小胞輸送・開口分泌の阻害により膵β細胞グルコース刺激誘導性インスリン分泌を抑制する 日本麻酔科学会第 67 回学術集会 Web 開催 2020 年 6 月 5 日 7. <u>広田 喜一</u> ポリサルファイド(H₂S_n)が細胞機能に与える影響の探究- Exploring the effects of polysulfide (H₂S_n) on cell function 第 93 回日本生化学会大会 Web 開催 2020 年 9 月 15 日			

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）：マスト細胞における Arf 経路の役割解明 丹京香織（研究医養成コース・3 回生）：Arf 阻害剤スクリーニング系の開発			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）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、高次生命現象の過程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。令和元年～2 年は特に T 細胞とマスト細胞に焦点を当て、Arf 経路の欠損が及ぼす影響の検証に取り組んだ。また、並行して、Arf 経路の新規阻害剤同定に向けたスクリーニング系の樹立に着手している。 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 Arf1/6-TKO を用いて、さらに Arf 欠損が T 細胞機能に及ぼす影響を調べた。すると、ヘルパーT 細胞の中でも特に Th17 細胞と呼ばれるサブセットが関与することが知られる実験的自己免疫生脳脊髄炎（EAE）の発症が著しく抑制されていることが明らかとなった。そこで、同じく Th17 細胞が関与する、Rag2-KO マウスへのナイーブ CD4 ⁺ T 細胞移入大腸炎誘発モデルを用いて Arf 欠損の影響を調べたところ、予想どおり、Arf 欠損ナイーブ CD4 ⁺ T 細胞を移入した Rag2-KO マウスでは、大腸炎の発症が完全に抑制されていた。各種の解析の結果、Arf 欠損ナイーブ CD4 ⁺ T 細胞は活性化過程において高頻度でアポトーシスを起こすことが分かり、アポトーシス誘導因子である Bim の高発現がその背景に存在することが明らかとなった。このことが <i>in vivo</i> における病的な Th17 細胞の出現を抑制し、ひいては免疫病態の抑止に繋がっているものと考えられる。現在、Arf 経路と Bim の発現調節機構の関係性を検証中である。 アレルギー反応のエフェクター細胞として知られるマスト細胞は、骨髓細胞を IL-3 共存下に培養することで <i>in vitro</i> で分化誘導可能である。Arf ファミリーの発現を調べたところ、T 細胞と異なり Arf1 が突出して高発現していたため、Arf1 がマスト細胞分化に関与する可能性を考え、タモキシフェン誘導性に目的の遺伝子を欠損可能な CreER ^{T2} マウスと Arf1-flox マウスを交配して得られたマウス（以下、Arf1-CreER ^{T2} ）由来の骨髓を対象に解析を行った。分化誘導のごく初期からタモキシフェンを加えると、CreER ^{T2} マウス由来の骨髓を対象とした場合でも全ての細胞が死滅することが判明したため、マスト細胞への分化が方向付けられる培養開始後 2 週間の時点でタモキシフェン処理により Arf1 を欠損させるプロトコルを採用した。その結果、タモキシフェン			

ン処理した CreER^{T2} マウス由来マスト細胞に比して、タモキシフェン処理した Arf1-CreER^{T2} マウス由来マスト細胞の出現頻度は著しく減少することが明らかとなった。その後の解析から、Arf1 欠損マスト細胞では IL-3 刺激に伴う ERK 経路の活性化に障害が見られることが分かり、現在、その分子基盤を解析中である。

Arf ファミリーは GTP を結合する活性型になると標的分子と会合するようになる。そこで最近開発された split Venus を利用して、Arf1 とその標的分子である GGA3 の会合を非侵襲的にモニターする系の樹立に取り組んでいる。令和 2 年度は、Ras とその標的分子である Raf1 との相互作用を評価するモデル系の構築に取り組み、FACS によって両者の会合をモニターすることに成功している。

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) <u>Mami Sumiyoshi</u>, <u>Yui Kotani</u>, Yuki Ikuta, Kazutomo Suzue, Madoka Ozawa, Tomoya Katakai, Taketo Yamada, Takaya Abe, Kana Bando, Shigeo Koyasu, Yasunori Kanaho, Toshio Watanabe, and <u>Satoshi Matsuda</u>. Arf1 and Arf6 Synergistically Maintain Survival of T Cells during Activation. <i>J. Immunol.</i>, 202: 366-375 (2021). <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>Sumiyoshi, M.</u>, <u>Kotani, Y.</u>, and <u>Matsuda, S.</u> The role of Arf pathway in development of Th17-mediated autoimmune disease. 第48回日本免疫学会学術集会 (2019年12月12日、浜松) 2) 逆井 智貴、田中 順子、<u>松田 達志</u>、大嶋 健太、番 泰絵、飯塚 美桜、水野 聖哉、濱田 理人、高橋 智、三輪 佳宏 リンパ球近赤外イメージングマウスを用いたリンパ球集積の可視化による非侵襲的な炎症反応の検出と治療効果判定法の検討 第42回日本分子生物学会年会 (2019年12月3日、福岡) 3) <u>住吉麻実</u>、<u>小谷 唯</u>、金保 安則、渡邊利雄、<u>松田達志</u> Th17分化過程における低分子量Gタンパク質 Arf の機能 第42回日本分子生物学会年会 (2019年12月5日、福岡) 4) <u>小谷 唯</u>、<u>住吉 麻実</u>、平尾 敦、渡邊利雄、<u>松田達志</u> 制御性 T 細胞の高効率な分化誘導を目指したシグナル伝達経路の解明 第42回日本分子生物学会年会 (2019年12月5日、福岡) <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	徳弘 圭造
所属部門	代謝部門		
分担研究課題	精巣特異的ミトコンドリア膜分子の機能解析		
キーワード	受精・精子・不妊症		
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）			
徳弘圭造（学長特命准教授）研究の取りまとめ・実験の遂行と解析 福田尚代（助教）実験の遂行			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について）			
精子のミトコンドリアは鞭毛の中辺部に巻き付いたような特殊な構造をとっており、精子形成時の鞭毛伸長の際に重要な役割を果たしている。また、雌性生殖器内に射出された精子は子宮内を通過、排卵された卵子の待つ輸卵管へと移行、卵子の周りを覆う透明帯を通過して、卵子と膜融合を行うことにより受精が完了する。この過程において必要とする運動を支えるためにエネルギーを供給する重要な器官として、精子鞭毛部のミトコンドリアは必要不可欠な機能を果たしている。我々は精巣特異的に発現する遺伝子を解析していく中で、ミトコンドリア外膜に発現する遺伝子である Tomm20l(Tomm20-like protein 1)遺伝子に注目した。体細胞で発現する Tomm20 (translocase of outer mitochondrial membrane 20)は、ミトコンドリア移行シグナルがN末端に付加された前駆体タンパク質の認識及びミトコンドリアへの輸送を担う受容体複合体の中心的構成因子である。Tomm20l は精子形態形成が始まる時期に発現が高いことから、精子のミトコンドリア形成過程において重要な役割を果たしていると予想された。 生体内における Tomm20l の機能解析を行うために、CRISPR/Cas9 system を用いることにより遺伝子欠損マウスを作製して解析を行った。guide RNA を2種類使用して、exon1-exon2 を含んだゲノム上の領域を deletion した1ライン(483bp deletion)の欠損マウスを作製した。欠損マウスから副精巣精子を採取して解析を行った結果、形態・運動性や受精に必要な先体反応も正常に起こることが確認された。また、人工授精での受精率及び妊孕性を確認したところ欠損マウス精子は正常に受精し、妊孕性にも問題がないことが分かった(IVF 受精率:control 91.8±9.0%, del/del 88.4±10.4%, 産仔数: control 5.9±0.8, del/del 8.0±0.5)。このことから Tomm20l はマウスにおいて受精および精子ミトコンドリア形成過程に必須ではないと推測された。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	ゲノム編集部門	事業推進者名	徳弘 圭造
<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. Vogt EJ, Tokuhiko K, Guo M, Dale R, Yang G, Shin SW, Movilla MJ, Shroff H, Dean J. Anchoring cortical granules in the cortex ensures trafficking to the plasma membrane for post-fertilization exocytosis. Nature communications 査読あり 10(1):2271 2019 2. Nishida-Fukuda H The Exocyst: Dynamic Machine or Static Tethering Complex? BioEssays 査読あり 41(8):e1900056 2019 3. Aoki Y, Tsujimura A, Kaseda K, Okabe M, Tokuhiko K, Ohta T, O'Bryan MK, Okuda H, Kitamura K, Ogawa Y, Fujiki T, Wada M, Horie S, Nishimune Y, Tanaka H. Haprin-deficient spermatozoa are incapable of in vitro fertilization. Molecular reproduction and development 査読あり 87(5):534-541 2020 <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. 福田 信治, 福田 尚代, Deborah Lannigan, 東山 繁樹 Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2)の細胞内局在制御と細胞間接着の解析 第42回日本分子生物学会年会 福岡 2019. 12. 3-12. 6 2. 庄屋 祐希, 山中 聡士, 澤崎 達也, 福田 尚代 サリドマイド依存的タンパク質分解タグの開発 第42回日本分子生物学会年会 福岡 2019. 12. 3-12. 6 3. 庄屋祐希, 山中聡士, 福田尚代, 柴田哲男, 澤崎達也 標的タンパク質の選択的分解のためのIMiD誘導性SALL4デグロンシステム 第43回日本分子生物学会年会 オンライン開催 2020. 12. 2-12. 4 4. 福田尚代, 徳弘圭造, 松下博昭, 安東由喜雄, 和田守正, 田中宏光 HASPIN阻害剤CHR-6494の乳がん細胞増殖抑制効果の検証 第43回日本分子生物学会年会 オンライン開催 2020. 12. 2-12. 4 <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 一朗
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、JMJD3		
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 一朗：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（令和元（2019）・令和2（2020）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。 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。 次に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、p53の発現増加が認められた。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、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。また、RNAseq解析ではJmJCファミリーのヒストン脱メチル化酵素のうち、JMJD3の発現が食後高血糖・高中性脂肪血症により増加しており、JMJD3の阻害薬であるGSK-J4を投与すると食後高血糖・高中性脂肪血症に骨髄老化が誘導されなくなることから、食後高血糖・高中性脂肪血症のようなmetabolic stressがepigenetic regulationを介して骨髄老化をきたす可能性が考えられた。 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 一朗
<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) 1. <u>Iwasaki M</u>, <u>Horitani K</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. Aberrant Postprandial Glucose/Triglyceride Spikes Promote Premature Aging of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells through JMJD3-mediated Epigenetic Regulation. (85th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, Yokohama, 2021.3) 2. <u>Iwasaki M</u>, <u>Horitani K</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. Postprandial Blood Glucose and Triglyceride Level Regulates HSC Transcription, Premature Aging and Rejuvenation. (84th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, Kyoto, 2020.7) 3. <u>Horitani K</u>, <u>Iwasaki M</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. The fluctuation of postprandial blood glucose and triglyceride level govern HSC metabolism, transcription, premature aging and rejuvenation. (36th Annual Meeting of the International Society of Heart research, Japanese Section, Kobe, 2019.12) 4. <u>Horitani K</u>, <u>Iwasaki M</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. Post Prandial Blood Glucose and Triglyceride Metabolism Govern Hematopoietic Stem Cell Transcriptional Regulation, Premature Aging and Rejuvenation. (Annual Meeting of the American Heart Association, Philadelphia PA, 2019.11) 5. <u>Iwasaki M</u>, <u>Horitani K</u>, <u>Kishimoto H</u>, <u>Wada K</u>, <u>Shiojima I</u>. Postprandial blood glucose and triglyceride govern hematopoietic stem cell transcription, metabolism, premature aging and rejuvenation. (3rd Japanese Circulation Society Council Forum on Basic Cardiovascular Research, Tokyo, 2019.9) <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	外科学講座	事業推進者名	海堀 昌樹
所属部門	①②代謝部門 ③がん部門		
分担研究課題	①②誘導型一酸化窒素合成酵素発現を指標とした培養細胞および臓器障害モデル動物を用いた薬剤の保護効果とメカニズムの解析 ③肝細胞癌に対する抗癌剤内包 PCL（ポリカプロラクトン）ファイバーシートを用いた新規局所治療デバイスの開発		
キーワード	①②nitric oxide synthase, nuclear factor-κB, rat primary cultured hepatocyte, rat liver injury model③ PCL、スマートシート、Drug Delivery System		
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） ①②企画（テーマ、人員構成、財源）(3)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣 実験と解析(7)；松島英之，菱川秀彦，中竹利知，坂口達馬，小塚雅也，橋本祐希，八田雅彦 考察、論文校正(6)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣，石崎守彦，松井康輔，徳原 克治 ③企画（テーマ、人員構成、財源）(3)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣 実験と解析(7)；吉田明史，菱川秀彦，松島英之，坂口達馬，小塚 雅也，橋本祐希，八田雅彦 考察、論文校正(5)；海堀昌樹，奥村忠芳，関本貢嗣，石崎守彦，松井康輔			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）年度の研究成果について） ①オメプラゾール(omeprazole, LPZ)は proton pump inhibitor (PPI)として、臨床で広く使用されている。LPZ 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、2 つのラット急性肝障害モデル（GalN/LPS と 70%肝切除/LPS）の survival rate を有意に増加させた[論文 in preparation]。オルプリノン（olprinone, OLP）は急性心不全治療薬として知られているカルシウムセンシタイザーである。LPZ と同様に、ラット初代培養肝細胞において、iNOS 誘導/NO 産生を抑制する。さらに、70%肝切除/LPS モデルの survival rate を増加し、様々な炎症性メディエーターの産生を阻害した[論文 in preparation]。 ②漢方薬“柴苓湯 saireito”がラット初代培養肝細胞において、NO 産生を阻害することより、“柴苓湯 saireito”の肝保護効果を報告した。本研究では“柴苓湯 saireito”の 12 herbs の効果を検討し、柴苓湯 saireito の 12 herbs のうち、半夏 hange を除いた 11 herbs で NO 産生の阻害を示した。特に、黄芩オウゴン ougon と桂皮ケイヒ keihi が iNOS 誘導を抑制し、強い NO 産生の阻害を示したが、桂皮ケイヒ keihi は IkBα 分解を綺麗に抑えることで、NF-κB 活性化を阻害している一方、黄芩オウゴン ougon は Akt 活性化を阻害し、IL-1RI 増幅を阻害しており、両者の阻害メカニズムは異なることを明らかになった [11]。[11] Matsushima H et al. Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes. Traditional and Kampo Medicine, April 2020; 7(1): 38-47. ③進行癌に対する抗癌剤治療は全身投与が一般的で、癌局所のみならず正常組織にも作用して副作用が現れる為、高い抗腫瘍効果を認めるにもかかわらず、副作用の為に化学療法を中止せざるを得ない場合も多い。本研究では、生体分解能を持ち、内包させた薬剤を長期間徐放する事ができるポリカプロラクトン(PCL)をナノ繊維状に加工したスマートシートに、肝細胞癌治療薬であるレンバチニブを内包させたレンバチニブ内包スマートシートを作製して肝細胞癌局所に直接貼付する事で、全身投与と比較して少ない薬剤使用量で抗腫瘍効果を維持した上で副作用を軽減し得るか評価した。BALB/c ノードマウスの皮下に高分化型ヒト肝癌由来細胞株である HuH-7 を移植するヒト肝細胞癌皮下移植マウスモデルを用いて、経口投与（10mg/kg/day）群、レンバチニブ内包シート皮下貼付群（対経口比 35%に減量）での抗腫瘍効果、有害事象の比較する実験では、経口投与量（10mg/kg/day×14days）の約 35%に減量したレンバチニブ 1.0mg/14days を含有したレンバチニブ内包シートは、経口投与群と比較して、シート貼付後 14 日目の腫瘍体積増加が 53.6% 抑制され、体重減少を認めず、高い抗腫瘍効果と副作用低減の可能性が示唆された。[論文 in preparation]。			

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) 2019(R1) - Dwijayanti DR, Okuyama T, <u>Okumura T</u>, Ikeya Y, Nishizawa M. The anti-inflammatory effects of Indonesian and Japanese bitter melon (<i>Momordica charantia</i> L.) fruit extracts on interleukin-1β-treated hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i>, 2019;9(1): 16-33. <u>Sakaguchi T</u>, Hashimoto Y, Matsushima H, Hishikawa H, Nishizawa N, <u>Okumura T</u>, Kaibori M. Levosimendan pretreatment improves survival of septic rats after partial hepatectomy and suppresses iNOS induction in cytokine-stimulated hepatocytes. <i>Scientific Reports</i>; (2019) 9:13398. - Nishizawa M, <u>Okumura T</u>, 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. <u>Nakatake R</u>, Hishikawa H, Kotsuka M, Ishizaki M, Matsui K, Nishizawa M, Yoshizawa K, <u>Kaibori M</u>, <u>Okumura T</u>. The proton pump inhibitor lansoprazole has hepatoprotective effects in in vitro and in vivo rat models of acute liver injury. <i>Dig Dis Sci</i>, 2019; 64: 2854-2866. <u>Ueyama Y</u>, <u>Tokuhashi T</u>, Miki H, <u>Nakatake R</u>, <u>Sakaguchi T</u>, Nishizawa M, <u>Kaibori M</u>, <u>Okumura T</u>. AHCC® has protective effects in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. <i>J Surg Res</i>. 2019 Jun 26; 243: 265-273. <u>Hishikawa H</u>, <u>Kaibori M</u>, Tsuda, T, <u>Matsui K</u>, <u>Okumura T</u>, Ozeki E, Yoshii K. Near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy with indocyanine green lactosomes has antineoplastic effects for gallbladder cancer. <i>Oncotarget</i>. 2019 Sep 24; 10(54): 5622-5631. - Ishii T, Okuyama T, Noguchi N, Nishidono Y, <u>Okumura T</u>, <u>Kaibori M</u>, Tanaka K, Terabayashi S, Ikeya Y, Nishizawa M. Anti-inflammatory constituents in <i>Atractylodes chinensis</i> rhizome improve glomerular lesions in immunoglobulin A nephropathy model mice. <i>J Nat Med</i>. 2020 Jan; 74(1): 51-64. - Tsuda T, Miki H, <u>Nakatake R</u>, <u>Sakaguchi T</u>, Hatta M, <u>Okumura T</u>, Nishizawa M, <u>Kaibori M</u>. Essential amino acid tryptophan inhibits induction of inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1β stimulated hepatocytes. <i>Bioactive Compounds in Health and Disease</i>, 2019; 2(7): 170-182. - Ozaki T, Kawaguchi Y, <u>Matsui K</u>, <u>Kotsuka M</u>, Iida H, <u>Kaibori M</u>, Nishizawa M, <u>Okumura T</u>, Sekimoto M. Effects of medicinal plant ipe on expression of inducible nitric oxide synthase in interleukin-1β-stimulated Hepatocytes. <i>Functional Foods in Health and Disease</i>, 2019; 9(10): 648-661. <u>Matsushima H</u>, <u>Kaibori M</u>, Hatta M, Ishizaki M, <u>Nakatake R</u>, <u>Okumura T</u>, Yoshii K, Todo T. Efficacy of a third-generation oncolytic herpes simplex virus in neuroendocrine tumor xenograft models. <i>Oncotarget</i>, 12-16-2019 in press. <i>Oncotarget</i>. 2019 Dec 24; 10(67): 7132-7141. doi: 10.18632/oncotarget.27391. eCollection 2019 Dec 24. 2020(R2) <u>Matsushima H</u>, <u>Hishikawa H</u>, Miki H, <u>Hatta M</u>, <u>Nakatake R</u>, <u>Okumura T</u>, Nishizawa M, <u>Kaibori M</u>, Sekimoto M. Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes. <i>Traditional and Kampo Medicine</i>, April 2020; 7(1): 38-47. - Ningsih FN, Okuyama T, To S, Nishidono Y, <u>Okumura T</u>, Tanaka K, Ikeya Y, Nishizawa M. Comparative Analysis of Anti-inflammatory Activity of the Constituents of the Rhizome of <i>Cnidium officinale</i> Using Rat Hepatocytes. <i>Biol. Pharm. Bull.</i> 2020; 43; 1867-1875. <国際学会発表> (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>Masahiko Hatta</u>, Takumi Tsuda, Hirokazu Miki, <u>Richi Nakatake</u>, <u>Tatsuma Sakaguchi</u>, <u>Tadayoshi Okumura</u>, Mikio Nishizawa, <u>Masaki Kaibori</u>. Essential amino acid tryptophan inhibits induction of inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1β stimulated hepatocytes. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019). <u>Masaya Kotsuka</u>, <u>Richi Nakatake</u>, Yuki Hashimoto, <u>Masahiko Hatta</u>, Terufumi Yoshida, <u>Masaki Kaibori</u>, Mikio Nishizawa, <u>Tadayoshi Okumura</u>. Omeprazole inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat primary cultured hepatocytes. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019). <u>Yuki Hashimoto</u>, <u>Masaya Kotsuka</u>, <u>Masahiko Hatta</u>, <u>Richi Nakatake</u>, <u>Tatsuma Sakaguchi</u>, Mikio Nishizawa, <u>Tadayoshi Okumura</u>, <u>Masaki Kaibori</u>. Sulfuraphane has a liver-protective effect through the suppression of inducible nitric oxide synthase. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019). <u>Katsuji Tokuhashi</u>, <u>Yosuke Ueyama</u>, <u>Tadayoshi Okumura</u>. The protective effects of AHCC® in ischemia-reperfusion injury of the small intestine. 27thICNIM (Sapporo, Japan, July 27-28, 2019). <u>Masaya Kotsuka</u>, <u>Richi Nakatake</u>, <u>Yuki Hashimoto</u>, <u>Masahiko Hatta</u>, Terufumi Yoshida, <u>Masaki Kaibori</u>, Mikio Nishizawa, <u>Tadayoshi Okumura</u>, Mitsugu Sekimoto. Omeprazole inhibits a production of proinflammatory biomarker nitric oxide in interleukin-1β stimulated hepatocytes. 41thESPEN (Krakow, Poland, August 31-September 3, 2019). <u>Richi Nakatake</u>, Takumi Tsuda, Hirokazu Miki, <u>Tatsuma Sakaguchi</u>, <u>Masaya Kotsuka</u>, <u>Masaki Kaibori</u>, <u>Tadayoshi Okumura</u>, Mikio Nishizawa, Mitsugu Sekimoto. Essential amino acid tryptophan has a			

liver-protective effect through the suppression of inducible nitric oxide synthase in primary cultured rat hepatocytes. 41thESPEN (Krakow, Poland, August 31-September 3, 2019).

7. Masaya Kotsuka, Masahiko Hatta, Hideyuki Matsushima, Hidehiko Hishikawa, Hirokazu Miki, Richi Nakatake, Tadayoshi Okumura, Mikio Nishizawa, Masaki Kaibori, Mitsugu Sekimoto. Cinnamomi Cortex and Scutellariae Radix in Japanese herbal medicine Kampo saireito inhibit expression of iNOS through different mechanisms in hepatocytes. 42thESPEN2020 (Lyon, France, September 19-22, 2020).
8. Terufumi Yoshida, Takashi Ozaki, Yusai Kawaguchi, Kosuke Matsui, Masaya Kotsuka, Hiroya Iida, Masaki Kaibori, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Mitsugu Sekimoto. Effects of medicinal plant ipe on expression of inducible nitric oxide synthase in interleukin-1 β -stimulated Hepatocytes. 42thESPEN2020 (Lyon, France, September 19-22, 2020).
9. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Masaya Kotsuka, Tetsuya Okuyama, Katsuhiko Yoshizawa, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Rene H. Tolba, Mitsugu Sekimoto. The proton pump inhibitor lansoprazole inhibits the expression of proinflammatory biomarker inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. 42thESPEN2020 (Lyon, France, September 19-22, 2020).
10. Richi Nakatake, Hidehiko Hishikawa, Masaya Kotsuka, Katsuhiko Yoshizawa, Mikio Nishizawa, Tadayoshi Okumura, Rene H. Tolba, Mitsugu Sekimoto. Protective effect of the proton pump inhibitor lansoprazole in lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats. 2020 ESSR (Innsbruck, Austria, December 9-11,2020).

<特許申請・取得状況>

特記事項なし

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） 統括責任者：楠本健司 実施責任者：鈴木健司、日原正勝、覚道奈津子、畔熱行、益岡弘、竹川政裕、田中寧子、尾崎祐次郎、 研究実施者：藤原奈都美、福井充香、Sharon N、Tien Minh Le、馬園園 （3名院生）青樹美恵（1名研究生）			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和2（2020）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。 脂肪組織由来幹細胞（ASCs） 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。 多血小板血漿（PRP） 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。 高圧脱細胞化 ：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。 骨再生 ：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。 電場負荷条件での細胞組織の保存 ：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) <令和元年度(2019 年度)> Ma Y, <u>Kakudo N</u>, Morimoto N, Lai F, Taketani S, <u>Kusumoto K</u>. Fibroblast growth factor-2 stimulates proliferation of human adipose-derived stem cells via Src activation. Stem Cell Res Ther. レフリー有 2019 Nov 27;10(1):350. doi: 10.1186/s13287-019-1462-z. Masuoka H, <u>Morimoto N</u>, Mahara A, Sakamoto M, Mitsui T, <u>Kakudo N</u>, <u>Kusumoto K</u>, Yamaoka T. Simple and efficient method for consecutive inactivation-cryopreservation of porcine skin grafts. J Artif Organs. レフリー有 2020 Jun;23(2):147-155. doi: 10.1007/s10047-019-01142-2. Epub 2019 Nov 3. Takegawa M, <u>Kakudo N</u>, Morimoto N, Hihara M, Masuoka H, Kusumoto K. Primary cutaneous adenoid cystic carcinoma on the lower leg. J Surg Case Rep. レフリー有 2019 Jun 28;2019(6):rjz201. doi: 10.1093/jscr/rjz201. eCollection 2019 Jun. Munisso MC, Morimoto N, Notodihardjo SC, Mitsui T, <u>Kakudo N</u>, <u>Kusumoto K</u>. Collagen/Gelatin Sponges (CGSs) Provide Both Protection and Release of bFGF: An In Vitro Study. Biomed Res Int. レフリー有 2019 Feb 19;2019:4016351. doi: 10.1155/2019/4016351. eCollection 2019. Nagama T, <u>Kakudo N</u>, <u>Fukui M</u>, Yamauchi T, Mitsui T, <u>Kusumoto K</u>. Heterotopic Endometriosis in the Inguinal Region: A Case Report and Literature Review. Eplasty. レフリー有 2019 Dec 3;19:ic19. eCollection 2019. <u>Matsuoka Y</u>, <u>Kakudo N</u>, <u>Fukui M</u>, <u>Kusumoto K</u>. Giant plexiform schwannoma in the plantar aspect of the foot: a case report. J Surg Case Rep. レフリー有 2019 Dec 4;2019(11):rjz352. doi: 10.1093/jscr/rjz352. eCollection 2019 Nov. <u>Hihara M</u>, Yagura T, Takegawa M, <u>Kakudo N</u>, Morimoto N, <u>Kusumoto K</u>. A novel fixation method for panfacial fracture using an Ilizarov-type external fixator. Trauma Case Rep. レフリー有 2019 Jun 22;22:100214. doi: 10.1016/j.tcr.2019.100214. eCollection 2019 Aug. <u>Fukui M</u>, <u>Kakudo N</u>, Morimoto N, Hihara M, Masuoka H, <u>Kusumoto K</u>. Squamous Cell Carcinoma Arising From an Epidermal Cyst of the Buttock: A Case Report. Eplasty. レフリー有 2019 Oct 21;19:ic18. eCollection 2019. <u>Kakudo N</u>, Morimoto N, <u>Ma Y</u>, <u>Kusumoto K</u>. Differences between the Proliferative Effects of Human Platelet Lysate and Fetal Bovine Serum on Human Adipose-Derived Stem Cells. Cells. レフリー有 2019 Oct 8;8(10):1218. doi: 10.3390/cells8101218. Le TM, Morimoto N, Mitsui T, Notodihardjo SC, Munisso MC, <u>Kakudo N</u>, <u>Kusumoto K</u>. 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 2019 Feb 21;14(2):e0208658. doi: 10.1371/journal.pone.0208658. eCollection 2019.

<令和2年度(2020年度)>

Le TM, Morimoto N, Ly NTM, Mitsui T, Notodihardjo SC, Munisso MC, Kakudo N, Moriyama H, Yamaoka T, Kusumoto K.

Hydrostatic pressure can induce apoptosis of the skin.

Sci Rep. レフリー有 2020 Oct 19;10(1):17594. doi: 10.1038/s41598-020-74695-5.

Lai F, Kakudo N, Morimoto N, Ma Y, Kusumoto K.

Preparing Activated Platelet-Rich Plasma for Culturing Human Adipose-Derived Stem Cells.

J Vis Exp. レフリー有 2020 May 4;(159). doi: 10.3791/60480.

Masuoka H, Morimoto N, Mahara A, Sakamoto M, Mitsui T, Kakudo N, Kusumoto K, Yamaoka T. Simple and efficient method for consecutive inactivation-cryopreservation of porcine skin grafts.

J Artif Organs. レフリー有 2020 Jun;23(2):147-155. doi: 10.1007/s10047-019-01142-2. Epub 2019 Nov 3.

Mitsui T, Morimoto N, Mahara A, Notodihardjo SC, Le TM, Munisso MC, Kakudo N, Yamaoka T, Kusumoto K.

High Hydrostatic Pressure Therapy Annihilates Squamous Cell Carcinoma in a Murine Model.

Biomed Res Int. レフリー有 2020 Mar 7;2020:3074742. doi: 10.1155/2020/3074742. eCollection 2020.

Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, Kusumoto K.

Effects of Fibroblast Growth Factor-2 Combined With a Collagen/Gelatin Sponge for Adipogenesis in the Mouse Subcutis.

Ann Plast Surg. レフリー有 2020 Feb;84(2):216-221. doi: 10.1097/SAP.0000000000002046.

Nakanishi Y, Kakudo N, Kusumoto K.

Use of a Lateral Orbital Flap for Lateral Canthal Reconstruction: A Case Report.

Eplasty. レフリー有 2020 May 27;20:ic10. eCollection 2020.

Hihara M, Kakudo N, Morimoto N, Hara T, Lai F, Jo J, Tabata Y, Kusumoto K.

Improved viability of murine skin flaps using a gelatin hydrogel sheet impregnated with bFGF.

J Artif Organs. レフリー有 2020 Dec;23(4):348-357. doi: 10.1007/s10047-020-01188-7. Epub 2020 Jul 6.

Notodihardjo SC, Morimoto N, Munisso MC, Le TM, Mitsui T, Kakudo N, Kusumoto K.

A comparison of the wound healing process after the application of three dermal substitutes with or without basic fibroblast growth factor impregnation in diabetic mice.

J Plast Reconstr Aesthet Surg. レフリー有 2020 Aug;73(8):1547-1555. doi: 10.1016/j.bjps.2020.01.031. Epub 2020 Jan 23.

<図書> (著者名・出版社・書名・発行年・総ページ数)

特記すべき内容なし

<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)

<令和元年度(2019年度)>

Ma Y, Kakudo N, Morimoto N, Lai F, Kusumoto K

Fibroblast growth factor-2 stimulates proliferation of human adipose-derived stem cells via Src activation

Plastic Surgery The Meeting 2019, San diego, USA, 2019/09/20

来方えん, 覚道奈津子, 馬園園, 楠本健司

Effect of platelet-rich plasma on the migration of human adipose-derived stem cells

第 11 回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会, 京都市, 2019/12/22

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 11 回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会, 京都市, 2019/12/22

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, 神戸市, 2019/03/22

<令和 2 年度 (2020 年度) >

覚道奈津子, 来方えん, 楠本健司

PRP 添加による脂肪幹細胞への影響

第 29 回日本形成外科学会基礎学術集会, 横浜市, 2020/10/09

楠本健司

PRP 療法の現状と課題

第 29 回日本形成外科学会基礎学術集会, 横浜市, 2020/10/09

<特許申請・取得状況>

特記すべき内容なし

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	代謝部門		
分担研究課題	2020 年度の研究課題名 ：LTBP2 ノックアウトマウスを用いることによる落屑症候群の病態解明 2019 年度の研究課題名 ：全身疾患モデル動物における網膜新生血管発症様式を OCT アンギオグラフィで検討する		
キーワード	ブルッフ膜弾性板、チン氏帯、LTBP-2、S1PR1、側副血行路、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	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） 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：2020 年度研究課題の研究遂行 高橋 元 院 生：2019 年度研究課題の研究遂行			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） 2020 年度の研究課題名 LTBP2 ノックアウトマウスを用いることによる落屑症候群の病態解明 以前、本教室の盛らが、マウスのブルッフ膜弾性板には、弾性線維形成に必須の上記 5 種のタンパク質（fibrillin-1, tropoelastin, fibulin-5, LTBP-2 および-4）がすべて存在することを明らかにした。さらに、マウスの眼内組織の弾性線維を有している組織の中で、チン氏帯に着目した。成人日本人失明原因第一位である緑内障の中でも、落屑緑内障は難治性である。落屑緑内障は、加齢に伴いチン氏帯が脆弱化もしくは断裂し、水晶体（亜）脱臼やシュレーム管に落屑物質が詰まる（あくまで推測）ことにより眼圧上昇をきたし、視野欠損を引き起こすとされる。本研究においては、まずチン氏帯の構成成分を調べ、免疫染色からの結果では、チン氏帯には fibrillin-1・tropoelastin・LTBP-2 が存在する一方で、fibulin-5, LTBP-4 は存在しないことが判明した。LTBP-2 ノックアウトマウスにおいては、摘出眼球の HE 染色においてまれに水晶体亜脱臼を呈した。チン氏帯、特に microfibril の主成分である fibrillin-1 による免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて野生型マウスと比較すると、チン氏帯の本数に大きな差が存在することが判明し、LTBP-2 ノックアウトマウスにおいては、チン氏帯形成不全が水晶体亜脱臼に寄与していると示唆された。残念ながら、臨床面におけるヒトで観察される落屑物質の発生はマウスではまだ認めていない（さらに、マウス用の眼圧測定器アイケアを用いても、野生型と LTBP-2 ノックアウトマウスに有意差は認めなかった）。ヒトでは老化に伴い、落屑物質が発生することから、現在、野生型および LTBP-2 ノックアウトマウスの老齢マウスを作成し、落屑物質の発生の有無を手持ち細隙灯検査で観察し、落屑物質が確認されたら、眼圧測定、隅角検査を行なって行く予定である。 2019 年度の研究課題名 全身疾患モデル動物における網膜新生血管発症様式を OCT アンギオグラフィで検討する 本教室の高橋（元）らは、ローズベンガルおよび網膜光凝固術を用いて、網膜静脈閉塞症モデルマウスの作成に成功した。臨床において、側副血行路の発生が視力予後に寄与するとされる。以前の研究においては、側副血行路の発生の評価を行うため、毎回マウス眼球を摘出し、網膜フラットマウント作成を行うことで、静脈閉塞および側副血行路の評価を行っていた。OCT アンギオグラフィが登場したことにより、マウスを殺さず、さらに経時的に静脈閉塞領域および側副血行路を観察することが可能となった。本研究では、血管を 1 本閉塞させるだけで、十分な側副血行路を生じることがわかった（逆に多くの血管を閉塞させると側副血行路を生じないことがわかった）。本教室の高橋（元）らは、側副血行路を生じるメカニズムとして、ずり応力と S1PR1 が関与するのではないかと推測した。S1PR1 のアゴニストとアンタゴニストを腹腔内投与し、アゴニストでは側副血行路が増加し、一方でアンタゴニスト投与群では減少することを OCT アンギオグラフィで証明した。さらに、Real-time PCR および免疫染色によって側副血行路発生の要因の 1 つとして S1PR1 が関与することを証明し、その結果を論文として出版した。			

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) 著者：<u>Hajime Takahashi</u>, Kazuki Nakagawa, <u>Haruhiko Yamada</u>, <u>Hidetsugu Mori</u>, <u>Shimpei Oba</u>, Keiko Toyama, <u>Kanji Takahashi</u> 表題：Time course of collateral vessel formation after retinal vein occlusion visualized by OCTA and elucidation of factors in their formation 雑誌名：HELIYON レフェリー：有 巻：7 ページ：e5902 発行年：2021 年 <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) 発表者名：<u>高橋元</u> <u>山田晴彦</u> 中川和紀 <u>高橋寛二</u> 発表演題：レーザー誘発性網膜静脈分枝閉塞症モデルにおける Optical Coherence Tomography Angiography 所見 学会名：第 1 2 3 回日本眼科学会総会 開催地：東京 発表年月：2019 年 4 月 発表者名：<u>高橋元</u> <u>山田晴彦</u> 中川和紀 <u>高橋寛二</u> 発表演題：Optical Coherence Tomography Angiography in laser-induced mouse branch retinal vein occlusion model 学会名：ARVO annual meeting 2019 開催地：カナダ バンクーバー 発表年月：2019 年 5 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	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	細胞外代謝物のX線マイクロイメージングと X 線吸収微細構造分析（2019 年度） 軟 X 線による細胞外代謝物に含まれる微量元素の化学結合の違いを利用した可視化法の開発（2020 年度）		
キーワード	軟 X 線、硫黄、細胞外代謝物、X 線吸収微細構造		
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 XAFS による細胞外代謝物の化学状態解析）			
研究成果の概要（令和元（2019）・令和 2（2020）年度の研究成果について） (1) 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細胞外代謝物で生成される。貝殻は、炭酸カルシウムと、その最表面にある数から十数ミクロン程度の厚さの有機物膜（殻皮）で構成されている。 貝殻は、幼生殻を起点として弧を描くように成長するので、殻皮も年輪のように成長し、剥離や溶解が起きても自己再生することはない。一般にシジミの殻の色は黒である思われているが、実際は黄色や紅黄色から黒色と多彩である。経験的に良い環境とされる底質で黄色系のシジミは多く取れる。プロジェクト参加研究者は、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、シジミの生育履歴や健康状態さらには、生息してきた環境変動を読み出すことを目指す。 2019 年度は、電子プローブマイクロアナライザー（Electron Probe Micro Analyzer;EPMA)と K 吸収端における X 線吸収微細構造（X-ray absorption fine structure: XAFS）で、殻皮に含まれる硫黄元素の深さ方向分布と殻皮に含まれる硫黄化合物の種類を決定した。その結果から、①黄色系の殻皮と黒色系の殻皮で含まれる硫黄の量と含硫アミノ酸の種類の違いがあること、②同じ固体でも幼生殻で構成されている殻頂（蝶番側）の殻皮と腹側（開く側）で殻皮に含まれる硫黄化合物の種類が異なることを明らかにした。さらに、鉄やマンガンの K 吸収端における XAFS を行い、貝殻の年輪に対応する成長線に沿って、鉄やマンガンが環境中と異なる化学状態で局在していることを確認した。 これらの成果は、2019 年に開催された Water and Environment Technology Conference 2019 (WET2019)で報告し、2020 年に Journal of Water and Environment Technology で公開した。 (2) 殻皮中の色素同定の予備的実験 生息環境の違いにより、殻皮の色には黄色系の殻皮と黒色系が存在する。色の由来となぜそのような違いが生まれるのかを解明を目指す。 自然界に最も広く分布する黒色色素ユーメラニンとで、黄色色素であるフェオメラニンからなるラニン色素が殻皮に含まれる色素であるであるという仮説を立て、実験を開始した。 2020 年度は、予備的実験として共鳴ラマン分光を行った。共鳴ラマン分光法はメラニンの同定への応用が期待されて、開発中の手法である。マウスの被毛（黒色と黄色）と殻皮（黒色系と黄色系）の共鳴ラマン分光を行い、殻皮にメラニンが存在する可能性が示唆されるスペクトルを得た（未発表）。 XAFS で、メラニン色素を持つ生体試料（マウスの被毛、赤色野鶏の毛）の分析を行い、XAFS でのメラニン色素同定の可能性を検討した。硫黄の K 吸収端で実験を行い、毛や被毛先を対象とした先行研究と同じ傾向の XAFS スペクトルが得られた。次年度以降、ユーメラニンとフェオメラニンの非破壊識別法について検討する。 現在、メラニン同定法として最も信頼されている液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)での分析の準備を行った。殻皮から色素を抽出する方法が課題であるが、文献から可能性のある手法をいくつか見つけることができた。次年度以降、この手法で実験を行う予定である。			

病態分子イメージングセンターに係る業績

講 座 等 名	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>Kuniko Takemoto</u>, Kei Mitsuhara, Masao Tabuchi, Yuka Segawa, Daiya Bamba, Toshiaki Ohta, Chemical State Analysis of the Periostracum in the Corbicula Clam Hatched in Lake Biwa, Journal of Water and Environment Technology, 査読有, 18(1):62-69, 2020. <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>Kuniko Takemoto</u>, Kei Mitsuhara, Masao Tabuchi, Yuka Segawa, Daiya Bamba, and Toshiaki Ohta, Chemical State Analysis of the Periostracum in the Corbicula Clam Hatched in Lake Biwa, Water and Environment Technology Conference 2019 (WET2019), Osaka, Jul 2019. [2] 井上栄壮, <u>竹本邦子</u>, 武井直子, 馬場大哉, 古田世子, 原裕規, 大柳まどか, 琵琶湖沿岸帯におけるシジミ類等の生息環境, 第 55 回日本水環境学会年会, 京都(オンライン), 2021 年 3 月 <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

平成 23 年 8 月 1 日

(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って充て、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、次の者をもって構成する。
 - (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、研究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 (平成29年2月15日)

この規程は、平成29年2月15日から施行する。

附 則 (平成29年4月1日)

この規程は、平成29年4月1日から施行する。

附 則 (平成30年4月1日)

この規程は、平成30年4月1日から施行する。

附 則 (令和2年4月1日第9248号)

この規程は、令和2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
令和元（2019）年度・令和 2（2020）年度
研究成果報告書
第 5 号
関西医科大学

令和 3（2021）年 10 月