

【基盤研究(S)】

生物系（総合生物）



研究課題名 大脳の記憶シナプスや回路の2光子顕微鏡と新規光プローブとを用いた研究

東京大学・大学院医学系研究科・教授 **かさい はるお**
河西 春郎

研究課題番号：26221001 研究者番号：60224375

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス、大脳、神経可塑性、脳機能イメージング、神経内分泌学

【研究の背景・目的】

大脳は心の住処と考えられている。即ち、心とは大脳を中心とする脳の高次機能のことである。最近の脳機能イメージングの研究は、様々の脳の高次機能が脳の各部位に局在している様子を明らかにしている。さて、それでは、各部位に局在する多様な脳高次機能、たとえば視覚や聴覚を担う脳の活動とは一体どういうものなのであろうか。これまでの、脳研究においては、それは脳を構成する神経回路の電気的活動に由来すると考えられてきた。神経細胞は長い軸索を出し多数の神経細胞をシナプスを作り、神経回路が構成される。この軸索を電気信号が走り、シナプスでそれが次の細胞に受け渡されることで、神経回路が活動する。しかしながら、この様な電気的活動は、麻酔下や睡眠時の様に意識されない状態でも見られ、電気的活動からのみ脳高次機能を理解することは困難に思われる。

我々は、神経回路の動作を決めるシナプスが、その結合強度を変えるときに、秒単位で形を変え運動することを見出した。この様によく運動するシナプス（棘シナプス）は、大脳でとりわけよく発達している。この運動は、神経回路の動作を反映するシナプス前後の細胞の同期的発火でもよく誘発される。更に、この運動は時に長期化し、記憶の特性を満たす。シナプスは神経細胞に数千個存在し、その運動は、神経細胞の発火より遙かに多様な状態をコードすることができる。

これらの知見を受けて、脳機能を理解するためには、大脳の神経細胞の運動性の分子細胞基盤をより詳細に解明し、覚醒脳における神経運動の可視化作業を進める必要がある。

【研究の方法】

当研究室は2光子顕微鏡による光刺激法を開発し、スパインの動的特性や分子基盤を世界に先んじて解明してきた。この成果に基づき記憶関連スパインを標識し、その後改変する技術：記憶シナプス光プローブ（記憶光プローブ）の開発に最近成功しつつある。本研究では、このプローブやシナプス前部の機能を反映する光プローブなどの確立・改良・応用を進め、スパインシナプスの認知機能への関与を可視化や操作的手法で明らかにする。また、記憶光プローブと脳透明化技術を組み合わせて広い脳領域で記憶回路をシナプスの解像で標識する技術を開発する。こうして、学習記憶・精神疾患に関わる神経回路の理解をシナプス前部、後部（スパイン）、そして両者

の相互作用まで踏み込んだ統合的な戦略により飛躍的に推し進める。

【期待される成果と意義】

これまでの脳機能、心、の理解は、神経細胞の電気的活動に基盤を置くものであった。我々の研究は、これに加えて、神経細胞の運動の果たす具体的な役割を可視化し、また、操作的に明らかにする作業を進めるものである。また、認知過程に伴うセルアッセンブリをシナプスレベルで明らかにすることにより、脳内計算過程や認知過程を可視化する道を開く。覚醒時の神経回路はこのシナプスの運動の影響を受けて、能動的に変化しているとすれば、神経回路の運動の観察により局在化している脳機能の謎が解かれ、知能や人格、精神新疾患の原因を明らかにする全く新しい手がかりが得られるかもしれない。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Takahashi, N., Hatakeyama, H., Okado, H., Noguchi, J., Ohno, M. & Kasai, H. (2010). SNARE conformational changes that prepare vesicles for exocytosis. *Cell Metabolism* 12:19-29.
- Hayama, T., Noguchi, J., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C.R., Hayashi, A., Takahashi, N., Matsuzaki, M. & Kasai, H. (2013). GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nature Neurosci.* 16:1409-1416.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度－30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

<http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp>
hkasai@m.u-tokyo.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系(総合生物)



研究課題名 ショウジョウバエ行動制御神経回路のコネクトミクス解析

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授 伊藤 啓

研究課題番号: 26221002 研究者番号: 00311192

研究分野: 神経科学一般

キーワード: 神経情報処理、コネクトミクス、モデル生物、イメージング、ショウジョウバエ

【研究の背景・目的】

罰や報酬と連合した学習の出力は、忌避や接近などの行動を惹き起こす。しかし連合中枢からの情報がどのように行動制御中枢に伝えられて、これらの行動に結びつくかは、ほとんど解析されていない。連合中枢と行動制御中枢を結ぶ情報伝達経路がきちんと解明されていないことが、この問題の理解を困難にする大きな課題になっている。

キイロショウジョウバエはごく小さな脳しか持たないにもかかわらず、下等哺乳類に匹敵する多彩な行動レパートリーと連合学習機能を持つ。また、特定の神経を可視化し、機能を操作するための高度な分子生物学的手法と遺伝子組換え系統リソースが揃っている。さらに、連合中枢と行動制御中枢が脳の狭い範囲に隣接しているという構造的特徴を持つ。

これらの利点を活かし、多様な神経ラベル法によって神経を体系的に同定して両中枢間の情報ネットワークを網羅的に明らかにするとともに、同定した神経のイメージングと機能操作によって、それらの神経が行動制御の際に示す反応や機能を解明する。

【研究の方法】

ショウジョウバエでは、酵母由来の GAL4 や大腸菌由来の LexA 転写調節因子をゲノムの 1ヶ所に組み込んで細胞種特異的な発現を誘導する系統群が、我々や他のグループによって既に 1 万系統以上提供されている。これらの系統をスクリーニングして、連合学習中枢であるキノコ体と中心複合体の入出力神経が投射する領域や、行動制御中枢の樹状突起が広がる領域に、他から突起を伸ばしているような神経を網羅的に同定する。これらの神経の投射構造を調べるとともに、伝達物質受容体やシナプス小胞の局在から入出力シナプスの分布を解析し、情報の流れを明らかにする。こうした情報を組み合わせ、連合学習中枢と行動制御中枢結ぶ直接間接の神経経路を体系的に解明する。

平行して、同定した神経においてカルシウム濃度感受

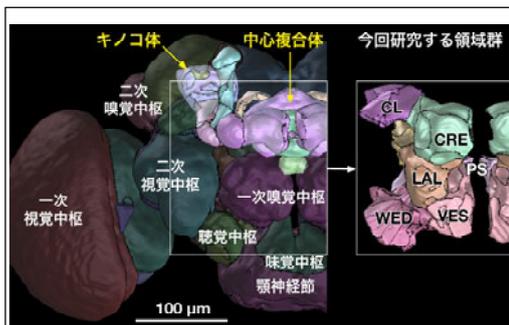


図1 ショウジョウバエの脳領域

性蛍光タンパクを発現させ、自由行動になるべく近い形に保持した動物で神経活動記録と行動パターン記録を同時に行い、同定した神経がどのような状況で活動するかを解析する。さらに、毒素タンパクを発現させて当該神経を阻害したり、熱または光依存性チャンネルタンパクを発現させて温度変化や光刺激によって当該神経を強制発火させることにより、動物の行動がこれらの神経の活動によってどのように変化するかを解析する。

【期待される成果と意義】

脊椎動物でも無脊椎動物でも従来の脳研究は、以前からよく調べられ、回路構造が比較的シンプルで、機能の概略もほぼ分かっている脳領域に集中して行われる傾向があり、それ以外の脳領域の知見には大きな落差があった。本研究は、従来ほとんど無視されていた多数の神経が網目状に入り組んだ脳領域において、神経接続を網羅的に明らかにするコネクトミクス解析の最初の試みであり、技術的なブレークスルーが大きい。また、連合中枢からの情報がどのように行動制御系に伝わるかを生理学的実験と組み合わせることで理解することにより、連合学習系の機能理解に不可欠な知見を提供する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Ito, K., Shinomiya, K., Ito, M., Armstrong, D., Boyan, G., Hartenstein, V., Harzsch, S., Heisenberg, M., Homberg, U., Jenett, A., Keshishian, H., Restifo, L., Rössler, W., Simpson, J., Strausfeld, N. J., Strauss, R., and Vosshall, L.B; The Insect Brain Name Working Group. A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron*, **81**, 755-765, 2014.
- Ito, M., Masuda, N., Shinomiya, K., Endo, K., and Ito, K. Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the *Drosophila* brain. *Curr. Biol*, **23**, 644-655, 2013.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
128,400 千円

【ホームページ等】

<http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/lab/itokei@iam.u-tokyo.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系(総合生物)



研究課題名 霊長類の大規模神経回路活動記録・操作法による部分的意識の生成機構の解明

自然科学研究機構・生理学研究所・教授

いさ ただし
伊佐 正

研究課題番号: 26221003 研究者番号: 20212805

研究分野: 神経科学

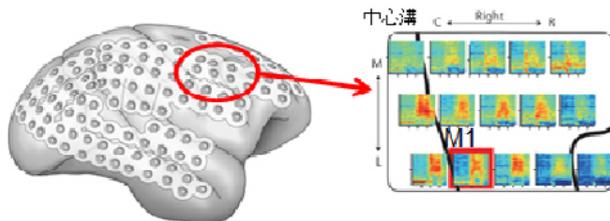
キーワード: 神経回路、意識、盲視、霊長類、皮質脳波

【研究の背景・目的】

一次視覚野損傷により視覚的意識が障害されても、障害視野の対象に対して行動できるという「盲視(blindsight)」という現象が知られている。片側の一次視覚野(V1)を損傷した盲視のモデルサル(モルモット)の認知機能と神経活動を解析した結果、これらのサルでは、視覚的意識は完全に消失しているのではなく、ヒトの若年時の損傷例に見られるような「何かある感じ」(Type II blindsight)に相当する「部分的意識」の存在が示唆され、それに対応する神経活動が上丘で観察されることがわかった。この部分的意識が生じるメカニズムを解明するため、盲視モデルザルの大脳皮質全体に数百チャンネルの皮質脳波(ECoG)電極、さらに上丘、視床など皮質下構造にも多極フィード電位記録電極を配置して、大規模神経回路動態を記録・解析し、部分的意識が生じる場合と生じない場合の比較、さらにウィルスベクターによる回路機能操作によって、部分的意識を操作する研究を実施する。

【研究の方法】

サルの大脳皮質外側面全体を覆うように数百チャンネルの ECoG 電極、上丘・視床などに LFP 記録電極を慢性的に留置し、安静時脳活動による default-mode network の解析や、視覚誘導性サッケード遂行時の活動を記録し、視覚入力からサッケード運動誘発までの信号処理過程を Granger 因果解析等を用いて推定する。さらに鍵となる脳部位・経路に対するムシモル注入による可逆的活動阻害やウィルスベクターによる経路選択的・可逆的伝達阻害を行い、行動の変容とその際の大規模回路動態の変容を対応付け、それらの脳部位、経路の機能を明らかにする。



(図) サルの全脳的 ECoG 記録(藤井らより)。このような大規模記録を盲視サルに適用し、同じ刺激に対して視覚的意識が生じたときと生じなかった時の脳全体の状態を比較する。

そしてこれらの解析手法を基盤として、視覚刺激が見えたかどうかを判断する Yes-No 報告課題にお

いて、同じ視覚刺激に対して「見えた」と回答した場合と「見えなかった」と答えた場合の脳活動の状態の違いを比較することで、「視覚的意識」が生じる機構を明らかにする。

【期待される成果と意義】

意識や注意など高次認知機能について近年機能的 MRI を用いたヒトでの研究によって種々の仮説が提示されているが、時間解像度の限界と脳に対する直接操作を行うことができないことから、因果律に踏み込んだ議論は困難だった。それに対して本研究では我々が過去 10 年間にわたって詳細にその認知行動と神経活動を解析してきた盲視モデルザルを用いて、ECoG と深部 LFP での多チャンネル記録を組み合わせた高時間解像度での大規模回路の動態機能解析を実現し、さらに遺伝子導入技術を組み合わせることで光操作や経路選択的的信号伝達遮断などを組み合わせた因果論的論証を実現しようとしていることが本研究の独創的な点である。世界的に見ても、機能的 MRI と回路操作の組み合わせや、ECoG による超多チャンネルを行っている研究グループはあるが、高時間解像度の ECoG 記録に経路選択的操作を組み合わせる大規模回路に適用しているのは申請者らのグループのみである。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Isa T, Yoshida M. (2009) Saccade control after V1 lesion revisited. *Curr Opin Neurobiol*, 19: 608 - 614.
- Takaura K, Yoshida M, Isa T (2011) Neural substrate of spatial memory in the superior colliculus after damage to the primary visual cortex. *J Neurosci*, 31: 4233-4241.
- Watanabe H, Sato M, Suzuki T, Nambu A, Nishimura Y, Kawato M, Isa T (2012) Reconstruction of movement-related intracortical activity from micro-electrocorticogram array signals in monkey primary motor cortex. *J Neural Eng*, 9:036006
- Weiskrantz, L. (1986). *Blindsight. A case study and implications.*, (Oxford: Clarendon Press).

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

<http://www.nips.ac.jp/hbfp/>

【基盤研究(S)】

生物系(総合生物)



研究課題名 生体の光学的な窓を利用した新規 *in vivo* イメージング技術の開発

筑波大学 医学医療系・教授

たかはし さとる
高橋 智

研究課題番号: 26221004 研究者番号: 50271896

研究分野: 実験動物学

キーワード: リサーチバイオリソース

【研究の背景・目的】

本申請では、生命科学研究の加速と実験動物福祉の促進を行うため、生体の光学的な窓に波長特性を有する新規蛍光タンパク質 *iRFP* とその誘導体を用いて、非侵襲的な *in vivo* 蛍光イメージング技術の開発と、様々な疾患で重要な要素となる血管新生、組織線維化、痛み刺激をモニターできるマウスを開発することを目的とする。

【研究の方法】

1. *in vivo* イメージングを効率化するための基盤技術の開発

1-1. 近赤外領域に蛍光波長を有するモニターマウスの開発: 生体では 650-900nm の光が最も吸収が少なく、光学的な窓 (Biological Optical Window) と呼ばれている。この光学的な窓に励起特性と蛍光特性がある蛍光タンパク質である *iRFP* または *iRFP* の誘導体を用いた蛍光観察法を確立する。

1-2. 反復して時期特異的に観察できる *iRFP* の開発: 平成 21 年度に採択された科学研究費 基盤研究 (S) の研究で、申請者らが開発した「デグラトン (Deg) プロンプ」を用いて、通常は分解されるが Tet 添加時のみ蛍光を検出できる Deg-*iRFP* を開発し、反復して時期特異的に蛍光が観察できる *in vivo* イメージング技術を開発する。

1-3. 蛍光観察を阻害するメラニン色素のオーダーメイド阻害法の開発: マウスを用いた研究では C57BL/6 マウスが標準系統として用いられているが、黒毛のため蛍光によるイメージングが難しかった。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて、既に確立された C57BL/6 背景の遺伝子改変マウスの Tyrosinase 遺伝子に点突然変異をオーダーメイドで導入してアルビノ化する技術を開発する。

1-4. 蛍光観察を阻害する体毛のオーダーメイド阻害法の開発: マウスの蛍光による観察の場合には、体毛は阻害因子となるため、多くの研究者は体毛を剃って観察している。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて *HR^{hr}* 変異をオーダーメイドで導入できる技術を確立する。

2. 様々な病態をモニターできるマウスの開発

2-1. *iRFP* により特定の細胞を追跡できるマウスの開発: *iRFP* をこれまで開発されている様々な Cre-driver マウスにより特定の細胞集団のみで発現させ、発現細胞を追跡できるマウスを開発する。

2-2. 血管新生をモニターできるマウスの開発: Flk1 および Flt1 遺伝子に *iRFP* を挿入したマウスを

開発し、時期特異的に *in vivo* において血管新生をモニターできるマウスを開発する。

2-3. 組織の線維化をモニターできるマウスの開発: 組織障害後の線維化時に産生が亢進する 1 型コラーゲンの転写を時期特異的に *in vivo* でモニターできるマウスを開発する。

2-4. 神経活動の履歴 (痛み刺激) をモニターできるマウスの開発: これまで開発してきた神経活動の履歴をデグラトン *iRFP* を用いて時期特異的にモニターできるマウスを開発する。

【期待される成果と意義】

本申請では、生命科学研究分野で盛んに使用されている蛍光イメージングを、生体の光学的な窓を利用することにより、より非侵襲的に生体内蛍光イメージング技術の応用範囲を拡張しようとするものである。これらの方法の確立により、マウスのみならず実験動物の非侵襲/低侵襲な経時的な観察が可能となり、科学的に十分な解析を行いつつ、実験動物の苦痛軽減、使用数の削減が可能となると考えられる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Mizuno S, Dinh TT, Kato K, Mizuno-Iijima S, Tanimoto Y, Daitoku Y, Hoshino Y, Ikawa M, **Takahashi S**, Sugiyama F, Yagami KI. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm Genome*. 2014.
- Tran TNM, Tanaka J, Hamada M, Sugiyama Y, Sakaguchi S, Nakamura M, **Takahashi S**, Miwa Y. *In vivo* image analysis using *iRFP* transgenic mouse. *Exp Animal*. in press.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
88,500 千円

【ホームページ等】

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>

【基盤研究(S)】

生物系（総合生物）



研究課題名 がん免疫病態の個体差の解明とその制御による個別化がん治療の開発

慶應義塾大学・医学部・教授

かわかみ ゆたか
河上 裕

研究課題番号：26221005 研究者番号：50161287

研究分野：総合生物、腫瘍学、腫瘍治療学

キーワード：がん治療、個別化治療、免疫療法、免疫病態、免疫制御

【研究の背景・目的】

がんの免疫病態には個体差が認められ、患者予後や治療反応性との関係が報告されているが、その詳細は不明である。その解明はがん病態における免疫の意義の理解だけでなく、バイオマーカー同定による診断法やその制御による治療法の開発につながる。

研究代表者は、今までの研究から、がん免疫病態の個体差は、がん細胞の内在性腫瘍抗原の状態や患者の免疫応答体質が関与する抗腫瘍免疫誘導系とがん細胞の遺伝子・シグナル異常に起因する免疫抑制系とのバランスにより生じる可能性を提唱してきた。

本研究では、臨床検体を用いたシステム生物学的・免疫学的解析、マウス腫瘍モデルやヒトがん細胞移植ヒト化マウスを用いた *in vivo* 実験等の手法を駆使し、ヒトがん免疫病態の個体差の意義と機序の解明、その結果に基づいた免疫制御による治療効果改善という新しい視点でがん治療法の開発を目指す。

【研究の方法】

1. 抗腫瘍 T 細胞誘導系の解明とその増強法の開発

腫瘍浸潤 T 細胞による自己がん細胞の認識を検証し、がん細胞特異的 T 細胞が樹立できた場合、共通腫瘍抗原や突然変異由来ペプチドなどの内在性腫瘍抗原に対する免疫応答を検討する。

T 細胞誘導系に関与する腫瘍・末梢血中の免疫細胞や免疫調節分子発現の解析による個体差の機序の検討、マウスモデルを用いて免疫誘導性がん細胞死誘導法（抗腫瘍剤等）やアジュバントや T 細胞活性化抗体などを用いた T 細胞誘導増強法を検討する。

2. 腫瘍免疫抑制系の解明とその改善法の開発

各種免疫細胞・間質細胞・がん細胞サブセットにより形成される免疫抑制病態の臨床検体を用いたシステム生物学的・免疫学的手法による個体差の機序の検討、またがん細胞や免疫細胞を用いた各種 *in vitro* 実験、およびマウス腫瘍モデルや各種ヒト化マウスを用いた *in vivo* 実験により、免疫抑制病態の細胞分子機構を解析し、同定した標的に対する薬剤を用いた免疫抑制病態の改善法を検討する。

3. 免疫調節薬併用による各種がん治療の治療効果増強作用の検討

上記で同定した免疫調節薬の併用による、免疫療法や化学療法など各種がん治療の効果増強作用を検討する。同定した治療標的の発現と臨床病理学的因

子との相関解析などにより、標的分子や細胞の診断バイオマーカーや治療標的としての臨床的意義を確認後、意義を検証するための臨床試験を提案する。

【期待される成果と意義】

本研究は、がん免疫病態の個体差の細胞分子機構と生物学的意義の解明だけでなく、「がん免疫病態を標的とした新規がん診断法や個別化治療法の開発」を目指すという、概念的にも方法論的にもユニークな研究である。本研究の成果は、がん生物学の発展に加えて、広くがん治療において、効果の期待できる症例の選択や治療効果の増強法の開発につながり、科学的にも社会的にも貢献できる。

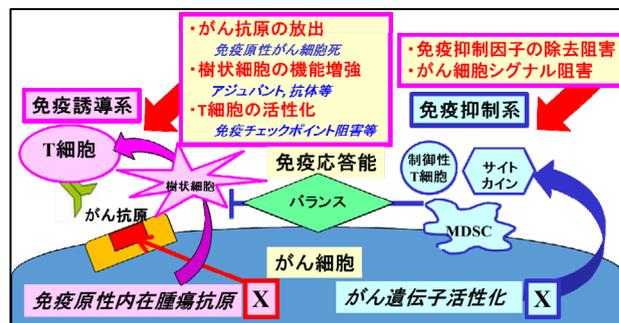


図. 抗腫瘍 T 細胞応答の個体差の原因と免疫病態改善薬によるがん治療の効果増強

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Kawakami Y, et al. Roles of signaling pathways in cancer cells and immune cells in generation of immunosuppressive tumor associated microenvironments. in "The Tumor Immuno-environment", Springer Science p307-323, 2013
2. Galon J, Kawakami Y, et al. Towards the introduction of the Immunoscore in the classification of malignant tumors. J Pathol. 232: 199-209, 2014

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度－30 年度
150,100 千円

【ホームページ等】

<http://keiocancer.com/>

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 寿命と発生を制御するシグナル伝達ネットワーク

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

にしだ えいすけ
西田 栄介

研究課題番号: 26221101 研究者番号: 60143369

研究分野: 機能生物化学

キーワード: 細胞情報伝達機構

【研究の背景・目的】

線虫 (*C.elegans*) は、分子遺伝学的アプローチが容易に使い、哺乳類に比べてライフサイクルが極端に短いため、寿命研究の非常に優れたモデル生物である。我々は以前の研究で、常に食餌を行うがその量を調節する「カロリー制限 (Calorie Restriction)」よりも、食餌を与える状態と与えない状態とを繰り返す「断続的飢餓 (Intermittent Fasting)」の方が、線虫の寿命延長に対して効果的であることを発見し、飢餓により活性化されるシグナル伝達経路と転写因子、及びその下流で寿命を制御する遺伝子群を解明してきた (Honjoh et al., *Nature* 457, 726-730. 2009; Uno et al., *Cell Rep.* 3, 79-91. 2013)。本研究ではこれらの成果をさらに発展させ、飢餓ストレスなどの外因性ストレスによる寿命延長において機能するシグナル伝達ネットワークの解明を目指す。特にエピジェネティクス制御、生体内低分子化合物による制御などに着目して解析を行なう。

また、発生過程を制御するシグナル伝達ネットワークを解明することも目標とする。我々はこれまで、アフリカツメガエル初期胚の背腹軸決定に、ERK MAP キナーゼシグナル伝達経路の活性化時間の制御が必須であることを示した (Hanafusa et al., *Nature Cell Biol.* 11, 106-109, 2009)。また ERK シグナル伝達経路の持続的活性化によって発現誘導される遺伝子として以前同定していたプロテインキナーゼ SGK1 が、多段階から成る細胞間シグナル伝達経路を経て初期胚外胚葉細胞の生存を促進することを見出した (Endo et al., *Sci. Signal.* 4, ra2, 2011)。我々は引き続きアフリカツメガエル胚における ERK 経路の機能解析を進め、特に神経や表皮などの外胚葉において ERK シグナル伝達経路により転写制御を受ける遺伝子群に着目して解析を行なう。ERK 以外の MAP キナーゼおよび関連シグナル伝達経路の発生過程における機能解析も行なう。また、発生および再生を制御する外因性因子 (栄養、機械的ストレスなど) を同定し、その下流で機能するシグナル伝達ネットワークについて、エピジェネティック経路も含めて総合的に解析する。

【研究の方法】

寿命や発生を制御するシグナル伝達ネットワークについて、線虫並びにアフリカツメガエルをモデル系として解析する。具体的には、マイクロアレイや次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現及びエピジェネティクス解析、バイオインフォマティクスによる *in silico* 転写因子予測 (Sunadome et al., *Dev. Cell* 20, 192-205. 2011; Uno et al., *Cell Rep.* 3, 79-91. 2013)、変異体や RNAi 法による体系的スクリーニング、モルフォリノによるノックダウン実験、ケミカルバイオロジー的手法などにより研究を進める。

【期待される成果と意義】

本研究は、寿命および発生を制御する新規シグナル伝達ネットワークを同定し、栄養やストレスなどの外因性因子と寿命および発生の密接な関係性を解明するとともに、関連するエピジェネティック経路についても明らかにするものであり、寿命および発生を制御する分子機構の包括的理解に迫るものである。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Uno, M., Honjoh, S., Matsuda, M., Hoshikawa, H., Kishimoto, S., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Yamamoto, T., Matsumoto, K., and Nishida, E. A fasting-responsive signaling pathway that extends life span in *C. elegans*. *Cell Rep.* 3, 79-91 (2013).
- Endo, T., Kusakabe, M., Sunadome, K., Yamamoto, T., and Nishida, E. The kinase SGK1 in the endoderm and mesoderm promotes ectodermal survival by down-regulating components of the death-inducing signaling complex. *Sci. Signal.* 4, ra2. (2011).

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/signal/>

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 優しく動かしてみる一分子生理学

早稲田大学・理工学術院・教授

きのした かずひこ
木下 一彦

研究課題番号: 26221102 研究者番号: 30124366

研究分野: 生物物理学

キーワード: 1分子計測・操作、タンパク質・核酸の構造・動態・機能

【研究の背景・目的】

たんぱく質の分子は、大きさが百万分の1 cmくらいしかありませんが、たった1個で見事な働きをします。たとえば、特定のイオンだけを選んで電気信号に応じて膜を通過させるイオンチャネルや、クルクル回りながら生体のエネルギー源であるATPを合成するF₁(エフワン)など、生体分子機械の名にふさわしい精緻さです。これら分子機械の仕組みを探索するため、顕微鏡下で個々の分子が働くところを観察し、さらに光や磁石などを使って操作してみるのが、一分子生理学です。

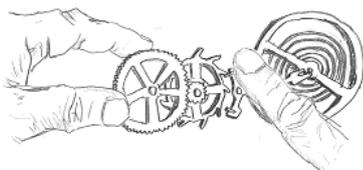


図1. 機械仕掛けの時計の心臓部を手で動かしてみる。

従来の一分子生理学は、観察が主で、操作する場合も本来の働きを邪魔してみるのが大部分でした。なるほどこういう仕掛けかも、という所までは迫

れるのですが、断定は難しいのです。複雑な機械、たとえば図1のテンプという時を刻む仕掛け、の働きを理解するには、自分の手で「動かしてやる」のが一番です。そっと優しい力でも動くのが正しい方向、抵抗も指先で感じ取れます。これを分子機械相手に試みます。本来の動力源や信号源、あるいは重要部品を取り去った上で、動かなくなるかどうかではなく、動かす道を探ります。

【研究の方法】

図2のabcを、当面の具体的研究目標に掲げます。

aでは、イオンチャネルの開閉の仕組みを追究します。電気信号に直接応答するのは、電位センサーと呼ばれる+の電荷をたくさん持つ部分で、これが電場により動くと、チャネルが開くというのが通説です。しかし電場は、他の部分にもいろいろな作用を及ぼします。そこで電場の代わりに、たとえば図のようにひもをつけて直接引っ張ってみたら、それだけで開くでしょうか(センサーの動きだけで十分であることの証明)。動かすのに必要な力は?

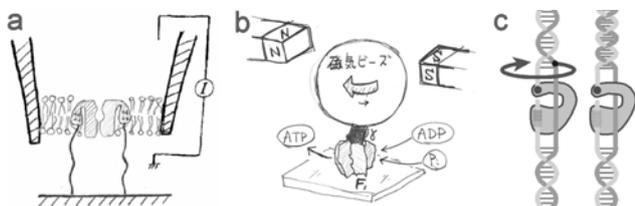


図2. たんぱく質分子機械を優しい力で動かしてやる。

bに示すF₁は、単独ではATPを分解しながら回る分子モーターなのですが、生体内ではF_oという別のモーターがF₁を逆回転させます。すると分解反応も逆転して、ATPが合成されるのです。その仕掛けの解明を目指し、磁石を使ってF₁を優しく逆回しします。どの角度でどんな抵抗があるか、あるいは逆回りでもすっと進む瞬間があるか、探ります。同時に、合成材料であるADPとリン酸(Pi)がどの角度で結合し、できたATPがどの角度で離れるのかも観ます。

cはreverse gyraseという分子機械で、右巻に捻れたDNAの二重鎖を、さらにきつく巻き上げます。高温でもDNAが簡単にほどけないようにして、温泉などに棲む好熱菌を守ると考えられています。やはり磁石を使ってDNAを捻り、reverse gyraseの働きを助けられるか、あるいは邪魔してしまうか、試します。

【期待される成果と意義】

分子を相手にして、動かしてやる、というのは至難の業です。しかし成功すれば、この力、この動きこそが鍵である、という、文字通り決定的な証拠が得られます。究極の一分子生理学の提唱です。

分子機械の部品間にはどのような力が働くのか、必要なのか、の解明とともに、新しい働き、新しい分子機械の創製にもつながり得ると期待しています。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- K. Adachi, K. Oiwa, M. Yoshida, T. Nishizaka, and K. Kinoshita Jr. "Controlled rotation of the F₁-ATPase reveals differential and continuous binding changes for ATP synthesis" *Nat. Commun.* **3** (2012) 1022.
- K. Yogo, T. Ogawa, M. Hayashi, Y. Harada, T. Nishizaka, and K. Kinoshita Jr. "Direct observation of strand passage by DNA-topoisomerase and its limited processivity" *PLoS ONE* **7** (2012) e34920.

【研究期間と研究経費】

平成26年度-29年度
115,600千円

【ホームページ等】

<http://www.k2.phys.waseda.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 気孔装置解析による植物独自の高次情報処理のパラダイム提案

九州大学・大学院理学研究院・教授 **いば こう**
射場 厚

研究課題番号: 26221103 研究者番号: 10192501

研究分野: 植物生理学

キーワード: 環境応答、気孔

【研究の背景・目的】

気孔は、光や湿度、CO₂、オゾンといった大気成分、生物学的エリキター刺激などの外部環境情報と、全身の代謝バランスなどの生体情報の集積地となっている。気孔は植物個体の成長や生存のために最適な体内環境を維持するようにこれらの情報を統合し、ガス交換効率を最適化する高度の情報処理システムを備えていることが考えられる。これまでにハイスループットサーマルイメージングの技法を用いた変異体スクリーニング(図1)により、気孔の形成や機能に関わるユニークな因子を同定してきた。本研究では、気孔を植物の高次情報処理・発信の主軸器官として捉え、そこで外部環境と植物体内の状況の把握と処理を担う因子や他器官(細胞)とのコミュニケーションに携わる因子の発掘をおこなう。

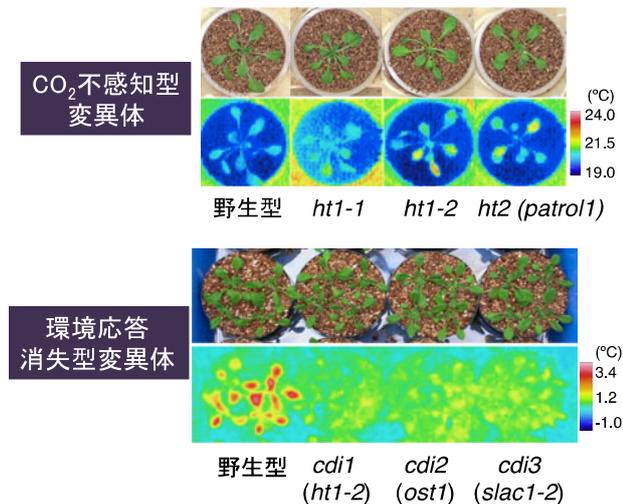


図1 葉面温度を指標としてシロイヌナズナから単離された気孔環境応答変異体の例

【研究の方法】

①サーマルイメージングによる気孔応答変異体スクリーニングにおいて、気孔の湿度応答とCO₂応答を分けることができる独自設計の環境試験機を投入し、複数の環境シグナルを統合するメカニズムに関係する新規変異体の単離を行う。それらの変異体の解析から、気孔の高次情報処理メカニズムの実体を探る。②表皮細胞には葉緑体は存在しないが、例外的に気孔(孔辺)細胞には葉緑体が存在し、気孔の高次情報処理中枢を担うことが想定されている。この葉緑体を欠失した変異体 *gles1* を用いて、気孔高次情報処理における孔辺細胞葉緑体の役割を

明らかにする。③気孔形成・機能化を統括する転写因子 SCAP1 の上流および下流に位置する因子を探索し、気孔器官の独自性がどのようなプロセスから生まれるのか明らかにする。

【期待される成果と意義】

生体情報の集積地となっている気孔における高次情報処理は多様な環境で植物が生き延びるための要であるが、その分子実体に迫る研究は極めて乏しい。上記の研究から発掘される新規因子の解析および新メカニズムの解明によって、その高次情報処理の仕組みを明らかにし、植物独自の情報統括処理のパラダイムの提案を行なうことを目標とする。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Hashimoto-Sugimoto, M., Higaki, T., Yaeno, T., Nagami, A., Irie, M., Fujimi M., Miyamoto, M., Akita, K., Negi, J., Shirasu, K., Hasezawa, S. and Iba, K. (2013) A Munc13-like protein in *Arabidopsis* mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nature Commun.* 4:2215 doi: 10.1038/ncomms3215.
- Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M. and Iba, K. (2008) CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* 452: 483-486.

【研究期間と研究経費】

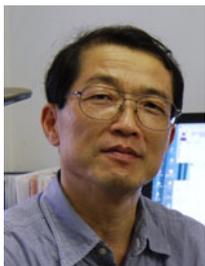
平成 26 年度-30 年度
150,100 千円

【ホームページ等】

<http://plant.biology.kyushu-u.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 生殖と性行動の協調的制御に関わるペプチドニューロンの生物機能に関する統合的研究

東京大学・大学院理学系研究科・教授

おか よしたか
岡 良隆

研究課題番号: 26221104 研究者番号: 70143360

研究分野: 基礎生物学: 動物生理・行動

キーワード: 神経生物学、神経生理学、ペプチドニューロン、GnRH、キスペプチン

【研究の背景・目的】

動物の生殖という現象は、神経系と内分泌系の巧みな協調によって調節されている。神経系で受容された温度・日長等の情報が、神経系・内分泌系の調節機構を通して生殖腺・配偶子の発達と性行動を協調的に調節し、生殖を成功に導く。

本研究では、申請者らが従来魚類脳の特徴を活かして世界をリードしてきた2種の異なるGnRHニューロン系と2種の異なるキスペプチンニューロン系の研究を基礎とし、最近重要性を発見したRFRPニューロンなども加えて、これらの各種ペプチドニューロンが生殖と性行動の協調的調節機能に果たす役割とその進化的意義を解明することを目的とする。さらに、これを通じて、環境変化への適応における神経系と内分泌系の協調的調節の機構とその進化・多様性という一般的な問題に対する、他の追従を許さない多角的かつ独創的な神経内分泌科学的研究の創成へと発展させることを目的とする。

調節における神経系と内分泌系の制御機構を、以下のようにして解析する。

- 1) GnRH1、RFRPニューロン等と脳下垂体が形成する生殖の中核制御(HPG軸調節)機構の解明
- 2) RFRP、キスペプチン(kiss1&2)、GnRH1&3ニューロン等が形成する、生殖と性行動の協調的中核制御機構の解明

【期待される成果と意義】

今回研究対象として取り上げたペプチドニューロンを中心として、生殖と性行動を協調的に制御する神経機構の全貌の解明が期待される。さらに、エストロゲン受容体のGFP標識TGメダカの解析から、生殖と性行動の協調的制御に重要な、さらなる未知ニューロンの同定も期待される。これらを通じて、環境変化への適応における神経系と内分泌系の協調的調節の機構とその進化・多様性という一般的な問題に対する理解が進む。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Karigo, T., Kanda, S., Abe, H., Okubo, K., and Oka, Y. (2012) Time-of-day dependent changes in GnRH1 neuronal activities and gonadotropin mRNA expression in a daily spawning fish, medaka. *Endocrinology* 153: 3394-3404.
- Kanda, S., and Oka, Y. (2012) Evolutionary insights into the steroid sensitive kiss1 and kiss2 neurons in the vertebrate brain. *Frontiers in Genomic Endocrinology*, 3:28. doi: 10.3389/fendo.2012.00028.
- Karigo, T., and Oka, Y. (2013) Neurobiological study of fish brains gives insights into the nature of gonadotropin-releasing hormone 1-3 neurons. *Frontiers in Endocrinology*, 4:177. doi: 10.3389/fendo.2013.00177.

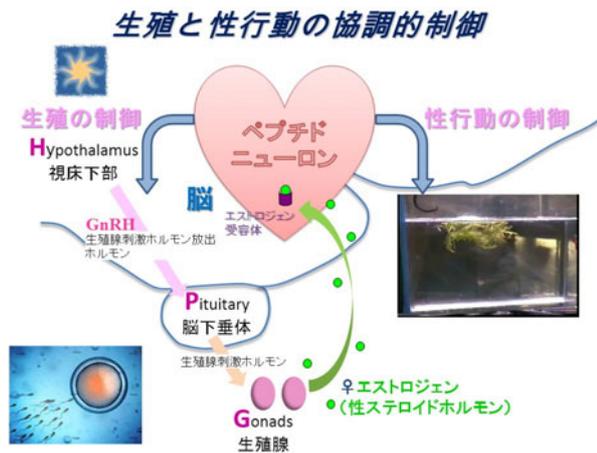


図1. ペプチドニューロンによる生殖と性行動の協調的制御

【研究の方法】

本研究では、この目的を達成するために、申請者らが従来開発・活用してきた、動物の特長を活かした実験系(ペプチド及びペプチド受容体遺伝子をGFPやCa²⁺インディケータータンパク質等で標識したトランスジェニック(TG)メダカや、遺伝子ノックアウトメダカ、およびGnRHニューロンの生理学的研究に最適な熱帯魚の脳)に最先端の生理学・形態学などの技術を適用して、生殖と性行動の協調的

【研究期間と研究経費】

平成26年度-30年度
77,700千円

【ホームページ等】

<http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/naibunpi/okay@bs.s.u-tokyo.ac.jp>

【基盤研究(S)】

生物系(生物学)



研究課題名 抑制と抗抑制によるエピゲノム動態制御機構の解明

情報・システム研究機構・国立遺伝学研究所・教授

かくたに てつじ
角谷 徹仁

研究課題番号: 26221105 研究者番号: 20332174

研究分野: 遺伝・染色体動態

キーワード: エピジェネティクス、DNAメチル化、シロイヌナズナ、クロマチン

【研究の背景・目的】

エピゲノム動態を理解するには抑制と抗抑制の両面を知る必要がある。しかしながら後者(抗抑制)の理解は遅れている。私達は、DNAメチル化に影響するシロイヌナズナ変異体を用いた遺伝学とゲノミクスによるアプローチで、ゲノム動態や個体発生に影響する新奇のエピゲノム抗抑制機構を見いだしている。本課題では、これを生かし、抑制/抗抑制によるエピゲノム形成と個体発生制御機構、および新奇DNA脱メチル化因子の分子機構という新たな問題を解明する。独自の研究素材とアプローチを生かしながら、エピゲノム制御という普遍的な生命現象の理解に貢献できると信じる。

【研究の方法】

課題1「ヘテロクロマチン制御様式と発生への影響の理解」

ヒストン脱メチル化酵素 IBM1 遺伝子の変異体では、遺伝子にヘテロクロマチンの目印が蓄積する。これにともない、多くの発生異常が誘発される(Saze et al 2008 Science; Miura 2009 EMBO J; Inagaki et al 2010 EMBO J)。興味深いことにヘテロクロマチンの蓄積は世代を超えて漸進的に進み、これにともない発生異常も強くなる。発生を指標に抑圧変異を選抜したところ、DNAメチル化酵素やヒストンメチル化酵素遺伝子の変異体とともに、ヘテロクロマチンを維持したまま発生異常を抑圧するものが見いだされた。これらの素材を用いた遺伝解析およびゲノム解析によって、ヘテロクロマチン蓄積の機構とそれが発生に影響する経路を理解する。

課題2「新奇DNA脱メチル化の分子機構理解」

DNA脱メチル化効果を持つタンパク質 VANC は、末端の逆位反復配列の崩れた DNA型トランスポゾンの解析を進める中で見いだした新奇因子である(Fu et al 2013 EMBO J)。VANCを発現させると、一群のトランスポゾンで全長にわたる脱メチル化が誘発される(図)。

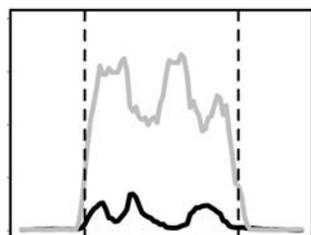


図 VANC発現個体におけるトランスポゾン全長の脱メチル化(黒色)。灰色はメチル化された対照系統

VANCによる低メチル化の誘導は、配列特異性が高いにもかかわらず、数Kbにわたる領域の全長でおこる点が興味深い(図)。この機構を知るため、染色体におけるVANCの分布を知る。また、VANCと結合するタンパク質を回収、同定する。また、エピジェネティックな過程に影響するシロイヌナズナ変異体下におけるVANCの効果を調べるとともに、その活性に影響する新たな変異体を選抜する。

【期待される成果と意義】

(課題1) 発生に伴うヘテロクロマチン変化の制御機構を理解する。また、ヘテロクロマチン蓄積から発生異常にいたる経路に関与する因子を解析し、その経路を理解する。

(課題2) 新奇DNA脱メチル化の機構を理解する。また、これに関与する宿主因子を同定する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Fu Y, Kawabe A, Etcheverry M, Ito T, Toyoda A, Fujiyama A, Colot V, Tarutani Y, Kakutani T (2013) Mobilization of a plant transposon by expression of the transposon-encoded anti-silencing factor. *EMBO J*. 32, 2407-2417
- Inagaki S, Miura-Kamio A, Nakamura Y, Lu F, Cui X, Cao X, Kimura H, Saze H, Kakutani T. (2010) Autocatalytic differentiation of epigenetic modifications within the Arabidopsis genome. *EMBO J* 29, 3496-3506.
- Tsukahara S, Kobayashi A, Kawabe A, Mathieu O, Miura A, and Kakutani T (2009) Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. *Nature* 303, 423-426.
- Saze H, Shiraishi A, Miura A, and Kakutani T (2008) Control of Genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in Arabidopsis thaliana. *Science* 319, 462-465

【研究期間と研究経費】

平成26年度-30年度
147,600千円

【ホームページ等】

<http://www.nig.ac.jp/labs/AgrGen/home-j.html>

【基盤研究(S)】

生物系 (生物学)



研究課題名 自然条件下における生物同調現象

京都大学・生態学研究センター・教授 **くどう ひろし**
工藤 洋

研究課題番号：26221106 研究者番号：10291569

研究分野：生態学

キーワード：分子生態

【研究の背景・目的】

同調現象は、生物の複数個体間の同時応答である。自然条件下で観察され、交配のタイミングをそろえる現象において卓越している。植物が決まった季節に開花するのも、個体間の交配を可能にする同調現象である。

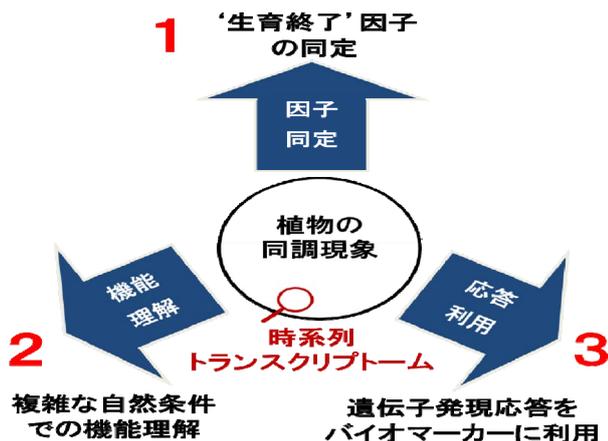
本課題では、「生物の同調現象」として植物応答を研究することにより、それにかかわるメカニズムの機能を自然条件下で理解することを目的とする。時系列トランスクリプトーム解析を元に3つの研究課題を実施する。

1. 新規に発見した‘生育終了’同調現象の制御因子を同定し、機能を解明する。
2. 複雑な自然状況下での遺伝子ネットワークの機能を理解する。
3. 遺伝子発現の応答をバイオマーカーとして利用し、環境を推定する。

【研究の方法】

時系列トランスクリプトームデータに基づき、三つのアプローチで研究を展開する(下図)。

1. **因子同定**：‘生育終了’の同調をもたらしている鍵因子を同定する。分子遺伝学的アプローチで同定し、機能解析する。
2. **機能理解**：自然の複雑な状況における環境記憶の機能に焦点を当て、自然集団の時系列ヒストン修飾解析を実施する。申請者らが始めた分子フェノロジーアプローチである。
3. **応答利用**：トランスクリプトームで得られるデータのパラメータ数の優位性を活用して「遺伝子発現→環境」モデリングを行う。

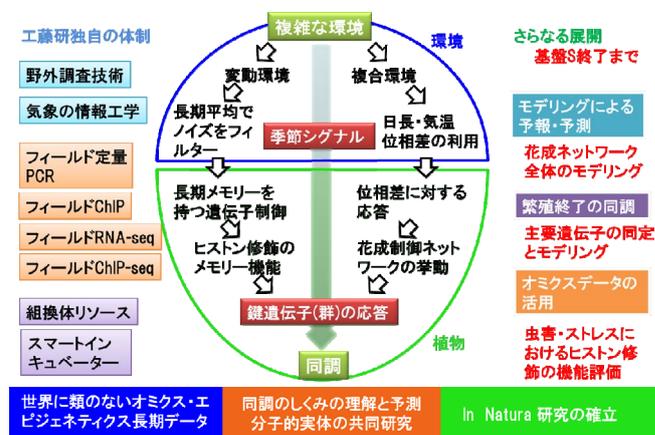


【期待される成果と意義】

これまでの花成制御の分子遺伝学研究は、発生的タイミングとして花成の促進・遅延(発芽からの日数)を解析してきた。しかし、メカニズム研究が、構成因子の同定から制御系の機能解明に推移するにつれ、自然条件下での同調現象(暦上の日付)としての評価が必須となる。以下の成果が期待される。

1. 生育終了(葉からの全バイオマス転流)にかかわる新規因子の機能が明らかとなる。
2. 遺伝子発現状態を細胞レベルで記憶するメカニズムであるヒストン修飾がもつ、自然生育地での役割が明らかとなる。
3. 植物が感知している環境をモデリングする技術が確立する。

研究の目的: 自然環境下での同調を理解する



【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

・ Kudoh H, Nagano AJ (2013) Memory of temperature in the seasonal control of flowering time: an unexplored link between meteorology and molecular biology. Pontarotti P ed. *Evolutionary Biology: Exobiology and Evolutionary Mechanisms*, Springer : 195-215.

【研究期間と研究経費】

平成26年度-30年度
150,100千円

【ホームページ等】

<http://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~kudoh/index.html>

【基盤研究(S)】

生物系(農学)



研究課題名 植物アルカロイド生合成系の分子進化の解明と代謝工学

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

さとう ふみひこ
佐藤 文彦

研究課題番号: 26221201 研究者番号: 10127087

研究分野: 農芸化学、応用生物化学

キーワード: 代謝工学、合成生物学、有用イソキノリンアルカロイド生産

【研究の背景・目的】

植物の二次代謝産物は25万種にも及び、その構造と生理活性の多様性から多くの研究者の関心を集めてきたが、含量が微量、かつ、代謝系が多岐にわたることより、その生合成系の分子生物学的・細胞生物学的解析、ならびに代謝工学的应用は遅れていた。

本研究では、これまでに我々が解明してきたキンポウゲ科(オウレン)ならびにケシ科(ハナビシソウ)のイソキノリンアルカロイド(IQA)生合成系に関する分子情報解析を基盤として、より広範なIQA、特に、進化的、あるいは、生合成経路的に異なるウマノスズクサ科(ウマノスズクサ)やヒガンバナ科(ヒガンバナ)、アカネ科(トコン)、ミカン科(キハダ)におけるIQA生合成の分子進化を分子細胞生物学的に解明し、代謝工学による多様な新規有用物質生産系を確立するとともに、その安定生産のための遺伝子発現制御系を確立する。

【研究の方法】

二次代謝産物のなかでもっとも多様な構造と生理活性を示す植物イソキノリンアルカロイド生合成系(図1)の分子進化の解明、代謝工学による代謝再構築、ならびに生理機能評価を行うために、まず、これまでに分子研究が最も進行しているケシ科ハナビシソウのIQA生合成系を対象に、そのゲノム構造とその遺伝子機能を解析し、その生合成ネットワークを解明する。

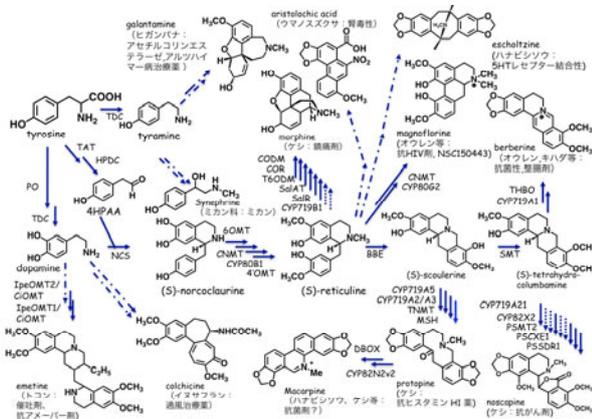


図1 対象とするイソキノリンアルカロイドとその生合成系

それとともに、異なるIQAを産生するアカネ科のトコン、ヒガンバナ科のIQA生合成系の分子レベルでの解析と代謝工学による改変制御、さらには生理機能評価を行う。また、キンポウゲ科やケシ科とは

進化的に遠縁になるウマノスズクサ科やミカン科(キハダ)のIQA生合成系との比較解析により、IQA生合成系の分子進化の統合的理解とその応用基盤を確立する。

【期待される成果と意義】

本研究により「ゲノム遺伝子配列情報を元にしたIQA生合成酵素ネットワークの解明」、「IQA生合成系の進化の解明」と「発現制御の統合的理解による有用物質生産系の確立」が期待できる。

特に、比較ゲノム解析により、トコンの作るエメチンや、ヒガンバナの作るガラタミンなど、reticuline経路とは異なる生合成経路(図1参照)、あるいは、ケシ科やキンポウゲ科から遠縁であるウマノスズクサやミカン科キハダにおけるreticuline生合成系酵素の分子進化の解明が期待できる。

また、代謝改変した植物細胞や、アルカロイド生合成系を組み込んだ大腸菌あるいは酵母を用いたアルカロイド生産系の開発により、有用植物アルカロイドの安定生産とともに、生理活性評価の推進による創薬シーズの開発が期待できる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Sato F., Kumagai, H. (2013) Microbial Production of Isoquinoline Alkaloids as Plant Secondary Metabolites Based on Metabolic Engineering Research. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 89, 165-182.
- Nakagawa A, Minami H, Kim JS, Koyanagi T, Katayama T, Sato F, Kumagai H. (2011) A bacterial platform for fermentative production of plant alkaloids. Nature Comm. 2, Article number: 326.

【研究期間と研究経費】

平成26年度-29年度
143,100千円

【ホームページ等】

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/callus/>
fsato@lif.kyoto-u.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系(農学)



研究課題名 アミロイドβの毒性配座理論を基盤としたアルツハイマー病の新しい予防戦略

京都大学・大学院農学研究科・教授 いりえ かずひろ
入江 一浩

研究課題番号: 26221202 研究者番号: 00168535

研究分野: 農芸化学、生物有機化学

キーワード: ケミカルバイオロジー、アルツハイマー病、アミロイドβオリゴマー、機能性食品成分

【研究の背景・目的】

アルツハイマー病(AD)の原因物質と考えられているアミロイドβタンパク質(Aβ42)は、2あるいは3量体を基本単位としてオリゴマー化することで神経細胞毒性を示す。その際、22, 23番目にターン構造をもつ毒性コンホマー(毒性Aβ)がオリゴマー化しやすいという、独自の「毒性配座理論(図)」を本研究代表者らは提唱した。最近、本理論に基づいて開発した抗毒性ターン特異抗体(11A1)は、細胞内Aβ(特に3量体)を強く認識し、世界的に注目されている。しかしながら、2量体を特異的に認識する薬剤はない。本研究では、2, 3量体それぞれに特異的に結合する抗体および核酸アプタマーを開発し、様々な分子量の会合体として存在する「毒性オリゴマー」を検出することによって、ADの正確診断に応用する。一方、本理論に基づいたノックイン型新規ADモデルマウスを作出し、開発した食品中の機能性成分および抗体による予防効果も検証する。

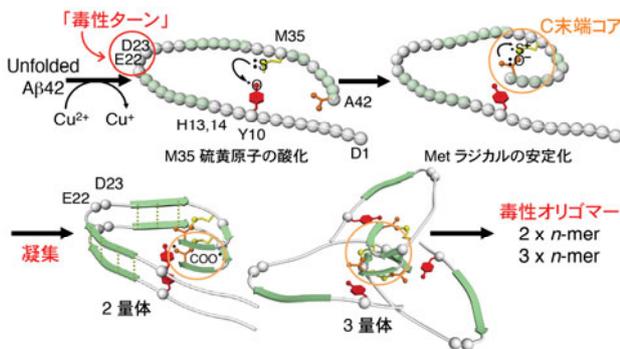


図 Aβ42の毒性ターンとオリゴマー推定構造 [Murakami, K. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 15168 (2005)]

【研究の方法】

1. 毒性Aβを標的とした抗体および核酸アプタマーの開発と診断法の確立

Aβ42の毒性配座理論(図1)に基づいて毒性Aβの2量体モデルペプチドを複数合成する。これらの神経細胞毒性を調べることによって、毒性オリゴマーモデルとしての妥当性を検証する。抗2量体認識薬として、本2量体モデルに対するモノクローナル抗体および核酸アプタマーを作製する一方で、抗3量体認識薬の作製は11A1抗体と同様の方法で行う。さらに、市販の抗Aβ抗体と抗毒性ターン抗体を組み合わせたサンドイッチELISAを構築するとともに、脳脊髄液などの生体試料を用いて診断薬としての応用

を検討する。

2. 毒性Aβのノックイン型ADマウスを用いた食品成分および抗体によるAD予防効果の検証

Aβの毒性配座を取りやすい配列をノックインした新規AD病態マウスを作出し、これまで再現が難しかった神経細胞死などの病態の有無を調べることによって、毒性オリゴマーと神経細胞死との関連について検証する。また、作出したADモデルマウスを用いて、前項で開発した抗体ならびに機能性食品成分によるAD病態の予防効果を評価する。食品成分としては、青ジソ由来の機能性成分に着目するとともに、これまで未解明であった体内動態を明らかにする。

【期待される成果と意義】

現状では根本的なAD治療が困難であることから、正確な診断法と食事などの生活習慣による早期予防法の確立がきわめて重要である。本研究は、独自のAβ42の「毒性配座理論」を基盤とした新しいAD診断法ならびに予防法の確立を目指すものである。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Sato, M., Murakami, K., Uno, M., Nakagawa, Y., Katayama, S., Akagi, K., Masuda, Y., Takegoshi, K., and *Irie, K.: Site-specific inhibitory mechanism for Aβ42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the Lys residues. *J. Biol. Chem.*, 288, 23212-23224 (2013).
- Murakami, K., Horikoshi-Sakuraba, Y., Murata, N., Noda, Y., Masuda, Y., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Shirasawa, T., *Shimizu, T. and *Irie, K.: Monoclonal antibody against the turn of the 42-residue amyloid β-protein at positions 22 and 23. *ACS Chem. Neurosci.*, 1, 747-756 (2010).

【研究期間と研究経費】

平成26年度-30年度
126,500千円

【ホームページ等】

<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp>
irie@kais.kyoto-u.ac.jp

【基盤研究(S)】
生物系(農学)



研究課題名 雄牛フェロモンの同定と実用化に関する研究

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

もり ゆうじ
森 裕司

研究課題番号: 26221203 研究者番号: 40157871

研究分野: 農学

キーワード: フェロモン、生体分子、牛、獣医学、繁殖学

【研究の背景・目的】

牛における繁殖障害の克服は、わが国の畜産業にとっての重要課題である。とくに乳牛の受胎率は低下の一途を辿り解決の糸口が見られず、繁殖障害が酪農業にもたらす損害は年間一十億円に達するとの試算もあり対応が急がれている。

本研究は、フェロモンの活用という新たな発想から繁殖障害の克服に取り組もうとするものである。牛と近縁の反芻家畜であるヤギやヒツジでは、「雄効果 Male Effect」というフェロモンによる強力な性腺刺激現象が科学的に解明されつつあるが、その一方で牛のフェロモンに関する研究は遅れている。

そこで本研究では、従来のホルモン等を用いる方法に代わる新たな乳牛の繁殖障害の治療・予防手段を開発することを念頭に、フェロモンを活用するための基盤研究として雄牛フェロモン (Bull Pheromone) の同定を目指す。すなわち本研究の第一の目的は、雌牛の性腺機能を刺激する雄牛フェロモンの単離精製と構造決定である。さらには天然フェロモンの分子構造に関する情報をもとに人工フェロモン徐放デバイスを開発し、雌牛の生殖機能促進に対する雄牛フェロモン実用化への道筋をつけることが第二の目的である。

【研究の方法】

私たちはこれまで、牛のモデル動物としてシバヤギを用いて、フェロモンの産生機構や作用メカニズムに関する研究を進めてきた。この実績を基盤に、本研究では牛を対象とした研究に取り組み、雄牛フェロモンを同定してその実用化を目指す(図1)。研究組織は長年にわたる共同研究のメンバーを中心に構成されるため、研究対象がヤギから牛に変わっても、フェロモン活性の生物検定、フェロモンリガンド分子の単離精製と構造解析、受容体の同定と中枢作用機序の解明、といった主要な課題に取り組むための研究戦略は変わらない(引用文献参照)。研究期間の終盤には、家畜牛を用いてフェロモン効果に関するフィールド規模での実証試験を行う計画である。

【期待される成果と意義】

本研究により雄牛フェロモンの実体と作用様式が解明されれば、リガンド分子や受容体の構造を近縁の種であるヤギと比較することで、哺乳類におけるフェロモンを介した情報通信の進化の実態が明らかになり、生殖生物学や神経科学など基礎科学分野に

とって大きな進展をもたらすことが期待される。さらに合成フェロモンを用いた繁殖障害の治療・予防が現実のものとなれば、その応用的価値はきわめて高いと予測される。例えば、わが国の乳牛では初回授精での受胎率が50%を割り込むなど、繁殖障害の存在が酪農経営の根幹を揺るがす隘路ともなっているが、繁殖障害のうちフェロモンのもつ性腺刺激効果によって劇的な改善が期待される疾患には、無発情、鈍性発情、不定排卵周期、卵巣のう腫、分娩後の卵巣機能不全など多くのものが含まれる。この方法は、牛が自ら産生するフェロモンを用いることで、環境汚染や毒性の心配がない、いわゆるクリーン・グリーン・エシカルな未来型畜産の根幹技術のひとつにもなり得るものであり、環境保護や動物福祉の観点から国際的にも注目を集めることが予測される。

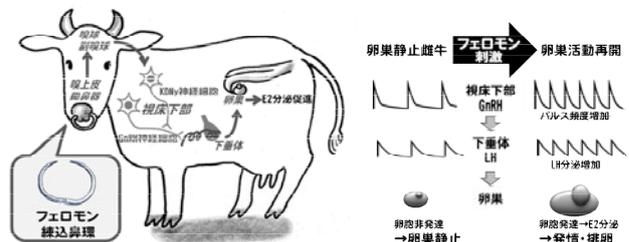


図1 フェロモンを利用した雌牛の性腺機能賦活の概念図

【左図】雄牛フェロモンを練り込んだ鼻環を装着すると、フェロモン受容器で感知される。フェロモン情報は、視床下部弓状核の神経細胞を刺激し、さらに性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の分泌を促し、下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌を介して卵巣に働きかけ、エストロジオール (E2) の分泌亢進を引き起こされる。
【右図】卵巣静止の雌牛では、GnRH のパルス分泌はゆっくりに(図中左側)、卵巣からのE2分泌も抑制されているが、フェロモン提示によりパルス頻度は上昇し、卵巣機能が刺激されてE2分泌が高まり、発情と排卵が惹起される(図中右側)。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

Murata K., Tamogami S., Ito M., Ohkubo Y., Wakabayashi Y., Watanabe H., Okamura H., Takeuchi Y., Mori Y. (2014) Identification of an olfactory signal molecule that activates the central regulator of reproduction in goats. *Current Biology* 24: 681-686.

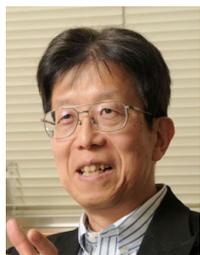
【研究期間と研究経費】

平成26年度-30年度
149,500千円

【ホームページ等】

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/koudou/j-pheromone.html>

【基盤研究(S)】 生物系(農学)



研究課題名 天然化合物の革新的標的分子同定法の確立とケミカルエピジェネティクス

理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・主任研究員

よしだ みのる
吉田 稔

研究課題番号: 26221204 研究者番号: 80191617

研究分野: 境界農学

キーワード: エピジェネティクス、プロテオーム、標的分子

【研究の背景・目的】

天然生理活性物質(天然物)には極めて強力で特異的な作用を示す物質が存在する。それらの標的分子と作用機構の解明は、ペニシリンを例に挙げるまでもなく、時として世界を変えるほどのインパクトを生物学に与えてきた。しかし、これまでの個別研究は試行錯誤の繰り返しによるものであり、生理活性物質の標的分子を迅速に同定し、作用機構を解明する効率的な方法論は確立されていない。本研究では、新しい化合物-標的相互作用検出技術を開発し、あらゆる化合物の標的分子を迅速、組織的に同定する系を構築する。それを基盤に未解明の天然物の作用機構を解明すると同時に、エピジェネティクスなど標的分子の機能に迫る。また、合成致死の概念をもとに、疾患原因遺伝子から治療標的遺伝子を同定し、新しい治療戦略を確立する。

【研究の方法】

バーコードシーケンス、イメージングを駆使して生理活性物質の標的分子を短時間で確実に決定できる総合システムを開発する。具体的には、分子バーコードが挿入された分裂酵母遺伝子破壊株、pooled shRNA ウイルスライブラリーを用いた動物細胞における薬剤感受性遺伝子の同定とネットワーク解析、二分子蛍光補完法(BiFC)を使った three-hybrid による化合物-標的間相互作用のスクリーニング系を構築する。このシステムと化合物ビーズを用いた相互作用解析を総合して、迅速に微生物由来、海洋由来天然物の標的分子・作用経路を同定する。また、エピジェネティクス因子に突然変異を有する疾患細胞に対して合成致死を誘導する shRNA を同定し、新たな創薬スクリーニング系を創出する。確立した標的

分子決定法とスクリーニング系を用いてこれまで作用機構不明であった天然物の標的分子を決定するとともにエピジェネティクスを中心とした細胞機能を制御しうる新たな化合物を同定する。

【期待される成果と意義】

自然界の多様な微生物、植物群は、独自の二次代謝系を進化させ、驚くべき生理活性を生み出す化合物を合成する。それらは人智を超えた化学構造と生理活性を人類にもたらしてきた。その作用機構の解明から画期的な創薬標的が同定されてきた。現在の承認薬、治験薬となっている医薬品の標的分子の多くが天然物の標的分子として同定されたものである。こうした生理活性化合物の標的分子同定のプロセスは、古典遺伝学との類似性から一般に「化学遺伝学」と呼ばれるが、技術的には合成化学と遺伝学の双方が必要で難易度は高い。さらに一般的な固定化アフィニティービーズによる標的分子の同定法は、標的分子との結合の可逆性や不安定性のために失敗することも多い。従ってバイアスのないゲノムワイドなケミカルゲノミクス技術の確立が必要である。本研究によって迅速、簡便に生理活性物質の作用機構が解明されるようになれば、新たな生命機能を理解し、制御するための化合物が発見できるだけでなく、医薬品開発を加速させ、副作用の推定も容易になる。健康、医療、環境のあらゆる面における化合物の有効利用に資するものと期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Nishimura, S., *et al.* Marine antifungal theonellamides targets β -hydroxysterol to activate Rho1 signaling. *Nature Chem. Biol.*, 6: 519-526, 2010.
- Ito, T., *et al.* Real-time imaging of histone H4K12-specific acetylation determines the modes of action of histone deacetylase and bromodomain inhibitors. *Chem. Biol.*, 18: 495-507, 2011.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
150,200 千円

【ホームページ等】

http://www.riken.jp/research/labs/chief/chem_genet/
http://www.riken.jp/research/labs/csrs/chem_genom/

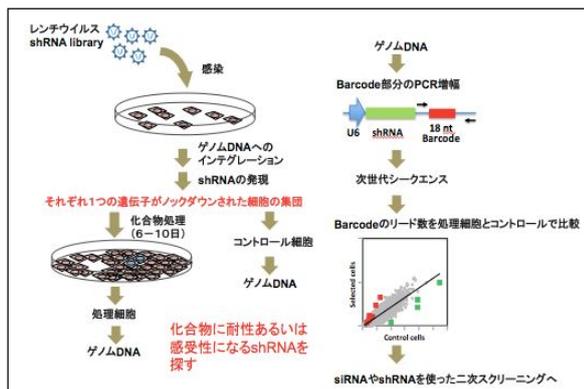


図1 分子バーコード shRNA による標的の同定

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 多官能基性化合物の位置選択的分子変換

京都大学・化学研究所・教授

かわばた たけお
川端 猛夫

研究課題番号：26221301 研究者番号：50214680

研究分野：有機合成化学

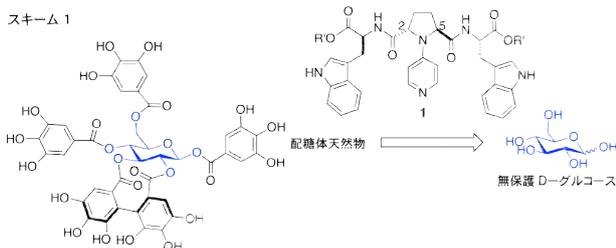
キーワード：糖、ペプチド、超分子、分子認識、不斉合成

【研究の背景・目的】

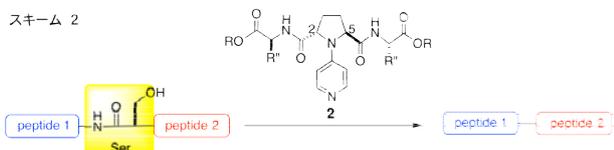
従来、多官能基性化合物の位置選択的官能基化は基質の反応性に準拠した保護-脱保護法によって行われてきた。本研究では触媒分子による精密分子認識に立脚した多官能基性化合物の直接的な位置選択的変換法を開発する。本研究は、官能基変換の化学を中心軸として発展してきた合成化学を、分子の全体構造を見据えた“真の意味での分子変換の化学”へと進化させ、合成法の革新を目指すとともに、動的分子認識の観点から有機化学の深化を図るものである。この位置選択的官能基化を駆使し、保護基の利用を最少限にした配糖体天然物の全合成、ペプチドの位置選択的解裂に取り組む。以上の分子変換は分子認識がキーワードであるが、これまでの分子認識の概念が及ばなかった超分子特有の可動性トポジカルキラリティーの不斉識別にも挑戦する。

【研究の方法】

触媒 **1** は 4 つの遊離水酸基を持つグルコピラノースの 4 位水酸基選択的アシル化を起こす。この特性を最大限利用し、無保護グルコースを出発物質とし、グルコース部分への保護基を用いない配糖体天然物の短段階全合成を行う。

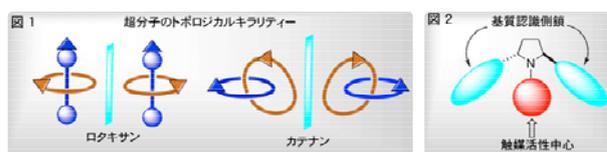


触媒 **2** は常温・中性条件下にペプチド結合をセリン残基の両側で切断し、セリン除去後再結合させるスプライシング様反応を起こす。本反応の一般化と適用範囲を見極める。



ロタキサンやカテナンは構成成分がアキラルでもそれらが非対称な場合には、超分子形成によりトポジカルキラリティーが発生する。このような超分子特有のキラリティーの不斉識別法を開拓する (図 1)。

触媒 **1** および **2** の優れた基質認識能はピロリジン環 2,5 位のアミド側鎖が担っている。この基質認識能と標的とする結合形成を触媒する活性中心を組み合わせ、位置選択的分子変換のための新しい分子認識型触媒を開発する (図 2)。



【期待される成果と意義】

糖類やペプチド類という普遍的な生理活性物質の生産法や変換法に従来とは質的に異なるアプローチを提供する。具体的には (1) これまでは基質の反応性に準拠した保護-脱保護法が唯一の方法であった糖類の合成に、基質本来の反応性とは独立した触媒制御による逆合成ルートを提案する。(2) 常温・中性条件下でのペプチド結合の位置選択的切断は有機合成の永年の夢である。セリン特異的スプライシング様反応を一般化し、生理活性ペプチドに適用を試み、関連領域でのブレークスルーにつながる成果を目指す。また、不斉合成分野で未解決課題であったトポジカルキラリティーを持つ超分子の触媒的不斉構築を行い、人工触媒による不斉識別の限界を打破する。さらに、未だ達成度が低い位置選択的官能基化分野で新しい触媒設計のコンセプトを発信する。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Kawabata, T.; Muramatsu, W.; Nishio, T.; Shibata, T.; Schedel, H. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12890-12895 (2007)
- Yoshida, K.; Mishiro, Ueda, Y.; Shigeta, Furuta, T.; Kawabata, T. *Adv. Synth. Catal.* **354**, 3291-3298 (2012).

【研究期間と研究経費】

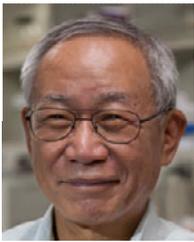
平成 26 年度 - 30 年度
93,600 千円

【ホームページ等】

<http://www.fos.kuicr.kyoto-u.ac.jp/>
(kawabata@scl.kyoto-u.ac.jp)

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 mDia が紡ぐアクチン細胞骨格の個体生理での役割と分子メカニズムの解析

京都大学・大学院医学研究科・特任教授 なるみや しゅう
成宮 周

研究課題番号：26221302 研究者番号：70144350

研究分野：基礎医学医化学一般

キーワード：生体分子医学

【研究の背景・目的】

アクチン細胞骨格は、細胞の形態、接着、移動、増殖、分裂に大きな役割を果たしている。これまでの研究で、培養細胞でのアクチン細胞骨格の形成と機能の大略が明らかになった。しかし、これらのメカニズムが個体でどう働いているかは明らかでない。我々は、これまで、Rho の下流でアクチン重合因子として働く mDia の3種のアイソフォームの遺伝子欠損マウスを作成し、Rho-mDia 経路で誘導されるアクチン細胞骨格が、赤芽球の細胞質分裂や脳組織構築に働くことを明らかにしてきた。本研究では、上記マウスでさらに見いだされた Rho-mDia 経路の神経シナプス前終末の可塑性、免疫 T 細胞の活性化、Sertoli 細胞-精子細胞相互作用による精子の形態形成、皮膚角化細胞のがん化での働きとメカニズムを明らかにし、細胞内で形成されるアクチン細胞骨格がどのようにして個々の細胞機能を制御し、それがいかにして組織の恒常性と可塑性に働いているかを明らかにしようとするものである。

【研究の方法】

本研究では、mDia の①シナプス終末での神経可塑性における働き、② TCR シグナリングにおける働き、③精子形態形成における働き、④細胞悪性化と皮膚発がんにおける働き、の4つのテーマで研究を行なう。テーマ1では、神経活動抑制時の mDia のシナプス前部への集積と mDia 依存的なシナプス前部の縮小(図1)を観察しており、その分子メカニズム

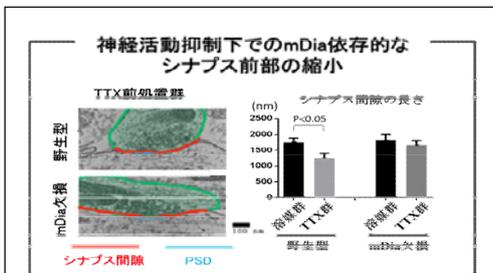


図1

mDia を欠損させたマウスのストレス行動を解析することで明らかにする。テーマ2では、mDia 欠損胸腺 T 細胞で TCR 刺激のシグナル伝達の障害(図2)を見ており、これより示唆される mDia によるアクチン細胞骨格の TCR シグナリングでの役割を解析する。テーマ3では、mDia 欠損マウス精巣で Sertoli 細胞に依存した精子の形態形成異常を見出しており、

そのメカニズムを明らかにする。さらにテーマ4では、mDia のがん化への寄与を DMBA/TPA を用いた皮膚がんモデルと in vitro の培養細胞の悪性化実験で検証し、その機構を解明する。いずれも、mDia

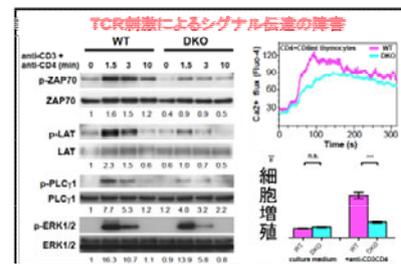


図2

アイソフォームの遺伝子欠損マウスを用いた in vivo の解析と in vitro の培養細胞実験を併用して、mDia が紡ぐアクチン細胞骨格の働きの本質を明らかにする。

【期待される成果と意義】

テーマ1から、post-synapse に比べ理解が遅れていた pre-synapse での神経可塑性のメカニズムを同定するとともに、それがどのような生理状態で働いているかが明らかになる。また、分泌のアクチン制御の原理が明らかになることが期待される。テーマ2と4からは、TCR シグナリングと細胞悪性化の各々での mDia の関与が明らかになるとともに、これまで薬物を用いた実験で繰り返し提唱されていたアクチン細胞骨格のシグナル伝達での働きが具体的に明らかになることが期待される。テーマ3からは、Sertoli 細胞のアクチン骨格が精子細胞にどのように働いて、精子の特異的な形態を形成するかが明らかになり、細胞間接着装置と細胞内アクチンがどう関わるかが明らかになると期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Thumkeo D, Watanabe S, Narumiya S. (2013) Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol.* 92:303-315.

【研究期間と研究経費】

平成26年度-28年度
132,400千円

【ホームページ等】

snaru@mfour.med.kyoto-u.ac.jp

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 幹細胞制御に着目した毛包の再生・老化ダイナミクスの解明から応用まで

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 **にしむら えみ**
西村 栄美

研究課題番号：26221303 研究者番号：70396331

研究分野：幹細胞医学、老化生物学、皮膚科学、実験病理学

キーワード：再生、老化、脱毛、組織幹細胞、自己複製、毛包幹細胞、色素幹細胞、白髪

【研究の背景・目的】

高齢化社会を迎え、癌をはじめとする加齢性疾患が顕著に増え続けており、その対策が急務である。加齢に特徴的な組織や臓器の機能低下や構築の変化は加齢関連疾患の発症基盤となるため、その実体と仕組みの解明は極めて重要な課題である。

申請者らは、マウスの毛包のバルジ領域に色素幹細胞を発見し (Nature, 2002)、相同の細胞集団がヒトにも存在し、加齢により枯渇すると白髪になること (Science, 2005) を世界に先駆けて見出した。続いて、加齢やゲノムストレスによって幹細胞がニッチにおいて分化し自己複製しなくなると幹細胞が枯渇し、成熟した色素細胞を供給できなくなるため白毛化へと至ること (Cell, 2009) を明らかにしてきた。つまり、このような幹細胞の枯渇へと繋がるステムセルエイジングが、典型的な老化形質の発現へと直結することを明らかにすることが出来た。さらに、幹細胞ニッチが色素幹細胞の運命を優勢に決定すること (Nature, 2002)、毛包幹細胞が色素幹細胞のニッチとして機能すること (Cell Stem Cell 2010, 2011) を明らかにし、その責任分子の同定を行ってきた。その一つとして明らかにしたヘミデスマソーム構成分子である XVII 型コラーゲン COL17A1 は、毛包幹細胞に発現し (図 1)、その自己複製においても必須であることを見出した (Cell Stem Cell, 2011)。以上のことから、加齢に伴う毛包幹細胞の加齢性変化 (ステムセルエイジング) が一連の毛包の加齢性変化の起点となりうる事が考えられる。他の組織においてもステムセルエイジングについて報告がなされてきているものの、実際の加齢性の組織変化との関連については殆ど明らかにされていない。

そこで、本課題では、COL17A1 などの幹細胞制御因子に着目した毛包幹細胞の自己複製の仕組みの解明と加齢性変化の解析から、上皮系組織が老化形質を発現する仕組みを明らかにする。特に COL17A1 が幹細胞の自己複製とそのエイジングにおいて果たす役割を解明し、一連の加齢性の組織構築変化が、毛包幹細胞またはニッチを起点とする組織特異的な老化プログラムによる可能性を検証する。これらのアプローチによって毛包と表皮の老化ダイナミクスの実体を明らかにし、毛包の再生と疾患克服へと応用する。

【研究の方法】

(1) 毛包・表皮の老化ダイナミクス解析

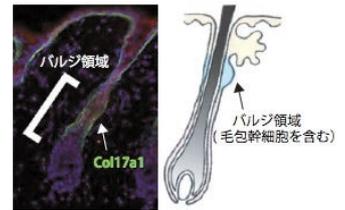
(2) 毛包幹細胞における老化シグネチャーの同定

(3) 加齢による毛包幹細胞制御分子の発現変化とその仕組みの解明

(4) 毛包幹細胞制御分子の conditional 欠損マウスを作製し、幹細胞の自己複製を制御する仕組みを解明

(5) 幹細胞ニッチに着目し組織構築と機能が変化する仕組みを解明する

(6) 幹細胞制御因子による再生医療、または先制医療への応用へと繋ぐ



(図 1)

【期待される成果と意義】

本課題によって、組織の老化には一定のプログラムが存在するのか、さらにステムセルエイジングが組織老化の起点となるのか、加齢性疾患の発症や病態との関連を明らかにすることが出来る。さらに本課題の遂行により、他の上皮系の他の組織へと応用される老化の基本原理を明らかにすることで、組織幹細胞の制御が再生医療や先制医療へと繋がることを示す。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

・ Tanimura S et al. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. **Cell Stem Cell**, 8, 177-187, 2011

・ Inomata K et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. **Cell**. 137(6):1088-99, 2009

・ Nishimura EK et al. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche **Science**. 307(5710):720-724. 2005

・ Nishimura EK et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem cell fate determination. **Nature**. 416(6883):854-60, 2002.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scm/>

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学 I)



研究課題名 Girdin ファミリー分子の機能と精神神経疾患・がんの病態形成における役割

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

たかはし まさひで
高橋 雅英

研究課題番号：26221304 研究者番号：40183446

研究分野：実験病理学

キーワード：疾患モデル動物・機能分子

【研究の背景・目的】

細胞運動には様々な外的刺激と細胞内シグナル伝達分子が関与し、その異常が様々な疾患発症や病態形成に関わっている。申請者らが発見し、研究を進めてきたアクチン結合蛋白 Girdin は運動する細胞の先端で Akt キナーゼによりリン酸化を受け、アクチン線維の再構成を引き起こすことによりがん細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、成体脳の新生ニューロンの運動を制御している。機能解析により Girdin はがん細胞の浸潤・転移能や血管新生、神経新生、海馬依存性の神経機能に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。本研究の目的は、Girdin およびそのファミリー分子 Daple によって制御される細胞機能の詳細な分子機構および精神神経疾患・がんの病態形成における役割を各種遺伝子改変マウスの作成、結合蛋白の同定による機能解析を通じて、明らかにすることである。

【研究の方法】

1. Girdin および Daple の精神神経疾患およびがんの分子病態における役割：Girdin および Daple 遺伝子 (図1) の遺伝子改変マウスを用いて、両分子の精神神経疾患およびがんの病態形成における役割について個体レベルで解明する。Girdin, Daple の神経新生や海馬依存性の長期記憶などの神経機能における役割について、病理組織学的、細胞生理学的、行動解析により進める。Girdin および Daple 遺伝子改変マウスとがん好発系のマウスとの交配や腫瘍を移植することにより、腫瘍の増殖、浸潤・転移における役割、腫瘍の微小環境に及ぼす影響について解析する。



図1 GirdinおよびDapleの構造

2. Girdin および Daple の結合タンパクの同定と機能解析：Girdin および Daple 両分子の細胞運動制御を含む細胞内機能をさらに解明するため、それぞれの分子の N 末端領域と C 末端領域に結合する分子群の包括的検索を行い、機能解析を推進する。

3. Girdin のチロシンリン酸化による機能制御：Girdin は EGF receptor や Src によってもリン酸化をうけることが明らかになった。これらのチロシンリン酸化による Girdin の機能制御について培養細胞および遺伝子改変マウスを用いて解析する。

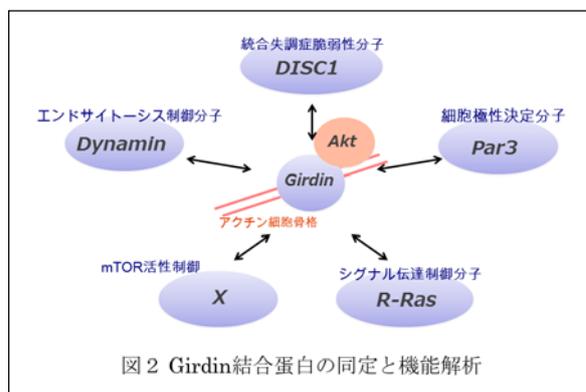


図2 Girdin結合蛋白の同定と機能解析

【期待される成果と意義】

本プロジェクトで Girdin および Daple の新たな結合分子の同定(図2)や作成する新規遺伝子改変マウスの解析を遂行することにより、がんの浸潤・転移や精神神経疾患の分子病態、さらに神経機能を含む細胞機能における Girdin と Daple の役割について新たな知見が得られ、この分野の研究の進展に大きく寄与できるものと考えられる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Ishida-Takagishi, M., Takahashi, M. et al. The Dishevelled-associated protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility. *Nature Commun.* 3: 859 (2012).
- Enomoto, A., Takahashi, M. et al. Roles of Disrupted in Schizophrenia 1 interacting protein Girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 63: 774-787 (2009).

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
149,800 千円

【ホームページ等】

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 Pathogenic な免疫記憶の形成と維持機構の解明

千葉大学・大学院医学研究院・教授 なかやま としのり
中山 俊憲

研究課題番号：26221305 研究者番号：50237468

研究分野：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫記憶、アレルギー・免疫関連疾患、獲得免疫、炎症、サイトカイン

【研究の背景・目的】

我々はこれまでに記憶 Th1/Th2 細胞の分化およびアレルギー性気道炎症（喘息）を制御する分子機構に関して、主に転写因子の役割に着目し、分子レベル、遺伝子レベル、クロマチンレベルでの研究を一貫して行ってきた。本研究では、免疫学領域で残されている一大テーマである免疫記憶（immunological memory）の形成と維持の分子機構に関する原理を明らかにする研究を行う。特に、「生体にとって有害な免疫記憶 T 細胞が分化し長期間維持される分子機構」をクロマチンレベルおよび生体レベルで解明する。実際には(1)我々が提唱している、アレルギーなどの Th2 病の発症に重要な“Pathogenic 記憶 Th2 細胞”（図 1）をモデル細胞にして、マスター転写因子やサイトカイン遺伝子の転写記憶（transcriptional memory）を担うエピジェネティック制御機構を解明する。(2) また、ポリコム及びトライソラックス分子群による記憶 T 細胞の機能変換・維持機構に関する解析を行う。(3) 環境因子（場）の解明と制御法の開発を目指す。

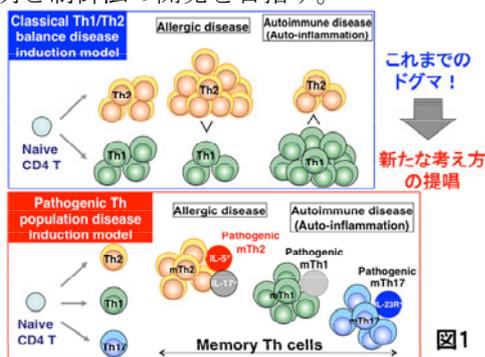


図1

【研究の方法】

3 点の研究を行う。(1)アレルギー性気道炎症を起こす“Pathogenic 記憶 Th2 細胞”の形成機構を解明するために、機能維持や可塑性（Plasticity）に関して ChIP-Seq 解析や RNA-Seq 解析などを用いたエピジェネティック解析を行う。IL-33 による Pathogenicity 誘導機構を解析するとともに、慢性副鼻腔炎患者でのポリコム中の記憶 T 細胞を用いてヒトの病巣の細胞で検証する。(図 2) (2) ポリコム及びトライソラックス分子群による記憶 T 細胞の機能変換・維持機構に関する解析では、EZH2 と Menin による記憶 Th1、Th2、Th17 細胞のサイトカイン産生機能発現と機能維持に関して、エピジェネティック解析を行う。(3) 記憶 Th 細胞の形成と維持を担う環境因子（場）の解明に関しては、記憶 Th2 細胞が集積した iBALT に焦

点を当て、多光子顕微鏡を用いた組織学的解析と共に、網羅的解析を組み合わせて記憶 Th2 細胞の形成と維持を担う機能分子の同定を行う。

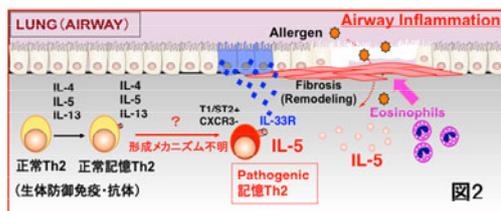


図2

【期待される成果と意義】

「免疫記憶」という免疫分野での大きなテーマに関して、その本質を分子レベル・クロマチンレベルで明らかにしようとすると同時に、Th1 病や Th2 病といわれる免疫関連疾患が“Pathogenic 記憶 Th1/Th2 細胞”で起こるといふ仮説を証明しようとする研究であり、学術的意義は大きいと考えている。

患者の炎症組織の細胞を解析する計画で、Human Immunology に視点をおいた研究といえる。ヒトでの免疫記憶細胞の数や機能増強法が明らかになれば、より有用なワクチンの開発にも資する成果となる。この研究成果をもとに、新規ワクチンが開発されればその社会貢献上のインパクトは甚大である。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Endo, Y., Nakayama, T. et al., Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol.* 35(2): 69-78 (2014).
- Tumes, D. J., Nakayama, T. et al., The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4⁺ T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* 39(5): 819-832 (2013).
- Kuwahara, M., Nakayama, T. et al., The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF- β and suppresses Th2 differentiation. *Nat. Immunol.* 13:778-786 (2012).

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度－30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/meneki/>

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 メモリーB 細胞の形成と維持を支える内的・外的メカニズム

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授

くろさき ともひろ
黒崎 知博

研究課題番号：26221306 研究者番号：50178125

研究分野：免疫学

キーワード：濾胞樹状細胞、液性免疫記憶、メモリーTfh、メモリーB 亜集団、高親和性獲得

【研究の背景・目的】

獲得免疫系で最も特徴的な現象は、免疫学的記憶を持つことである。メモリーB 細胞の場合、一度出会った抗原を覚えていて、2 度目に出会った時には初回よりも迅速に反応し高親和性 IgG 抗体を産生する。そしてこの迅速な反応を用いた予防・治療法はワクチン療法である。

このように、現象論的に「液性免疫記憶」の重要性は十分認識されているが、その特徴的性質（迅速反応性・高親和性・長期生存性）を支えるメカニズム研究は、これまで本格的に行われてこなかった。本研究では、高親和性 IgG1 抗体獲得・長期生存性獲得メカニズムに的を絞って、この特徴的な性質を支えている細胞・分子基盤を明らかにすることを目的とする。

【研究の方法】

ナイーブ B 細胞は、1 度目の抗原刺激により、他の免疫細胞群(例えば Tfh 細胞・濾胞樹状細胞(FDC))との *in vivo* 相互作用を介してはじめて、IgM メモリーB 細胞、IgG1 メモリーB 細胞のような、機能的に異なるメモリーB 細胞亜集団が形成されてくる。従って、「高親和性・長期生存性を支える内的・外的メカニズムは何か？」という課題に関して、この機能発現・機能獲得に必須の細胞群を、先ず明らかにする必要がある。そのために、細胞系列・サブセット特異的の枯渇マウスを樹立することにより検討する。

次に、それを支える分子メカニズム解明には、該当細胞群に的を絞り、ナイーブ状態、エフェクター状態、メモリー状態での分子の発現状態を RNA sequence、FACS 解析を用いて検討し、発現に変化が生じているものを中心に機能実験を用いて、さらにその分子の機能的意義、発現メカニズムを検討していく。

具体的には、

- (1)本研究遂行に必須の IgM メモリーB 細胞、IgG1 メモリーB 細胞系列特異的の枯渇マウス、及び fate-mapping マウスの樹立
 - (2)IgG1、IgM メモリーB 細胞の機能的差異の検討
 - (3)IgG1、IgM メモリーB 細胞の特徴的な機能を形成するメカニズムの探索
 - (4)濾胞樹状細胞(FDC)、メモリー濾胞ヘルパーT 細胞(T_{fh})のメモリーB 細胞生存寿命に与える影響検定。
- を行う。

【期待される成果と意義】

HIV ウイルス、インフルエンザウイルス感染からの防御免疫の中心は、メモリーB 細胞が抗体産生細胞へ分化し、高親和性 IgG 抗体を産生し、ウイルスを中和することであるが、これらのウイルスに対して長期間有効で、更に変異ウイルスに対しても効果的なワクチンの開発が待望されている。このためには、どのメモリーB 細胞サブセットをターゲットにしてワクチン開発をおこなえばいいのか、どの細胞系列がワクチン長期有効性に重要なのか、等の基礎的理解が不可欠である。

従って、本研究は、「メモリー機能のユニークな特性獲得に寄与している細胞レベル・分子レベルでの全体像解明」の重要なステップ、ひいては、「有効なワクチン開発」の基盤的データ提供とみなされるものである。本提案は、申請者らが独自に見出した重要な現象に立脚し、従来の概念とは異なる仮説構築を行い、検証しようとするもので独創的・先駆的な研究である。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Kometani T, et al. Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B Cells toward Plasma Cell Differentiation. *Immunity* 39, 136-147, 2013
- Ise W, Kometani K, Kurosaki T. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol* (in press)

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度－30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

http://lymph.ifrec.osaka-u.ac.jp/index_j.html

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 独自の培養系を用いた腸管上皮幹細胞における生体恒常性維持機構の解明

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

わたなべまもる
渡辺 守

研究課題番号: 26221307 研究者番号: 10175127

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 下部消化管学 (小腸、大腸)

【研究の背景・目的】

炎症性腸疾患では腸管上皮細胞の機能不全による腸内環境破綻が難治性の原因と示唆される。我々は腸管上皮幹細胞運命を人為的に制御し、腸内環境を改善させることが生体恒常性までもリセットすることにより炎症性腸疾患を根本的に解決できると着想した。そこで、独自に確立した「腸管上皮幹細胞初代培養」と「幹細胞移植モデル」をさらに発展させ、擬似腸管環境モデル構築による腸管上皮幹細胞の運命制御及び腸管免疫・内分泌制御を含めた腸内環境・生体恒常性への関与を解明する。最終的には腸管上皮幹細胞による腸内環境、生体恒常性リセットという新たな機序を創成し臨床応用への基盤を構築するだけでなく、腸疾患に留まらず生活習慣病などの全身疾患を制御できるという新しい概念を提唱するものである。

【研究の方法】

独自に確立した初代培養系を用いて、腸管上皮幹細胞の可視的・経時的な評価系を構築し、幹細胞の分裂・寿命・分化誘導制御を解析する。さらに腸内環境疑似モデルを構築し、上皮幹細胞と腸内細菌叢・腸管免疫制御・内外分泌ホルモン制御など腸内環境との相互関係を明らかとする。同時に高効率幹細胞移植モデルを構築した上で、腸内環境可変腸管上皮幹細胞を移植することで生体恒常性への影響を確認すると共に、慢性疾患モデルマウスへの移植による治療としての有効性を検討する。最終的に細胞移植もしくは新規薬剤による腸管上皮幹細胞を標的とした治療の生活習慣病を含めた慢性疾患患者へ対する有効性を検討する。

具体的には以下の解析を行う。

1) 初代培養オルガノイドによる擬似腸内環境モデルの構築

- 樹状細胞(DC)、上皮間リンパ球(IEL)と腸管上皮細胞共培養による相互作用解析系の樹立
- オルガノイド管腔内への細菌又は菌体成分注入による腸内細菌叢モデルの樹立
- オルガノイド食餌負荷モデルの構築

2) 腸管上皮幹細胞機能評価法の確立

- 1 幹細胞可視化による幹細胞動態解析
- 腸管上皮幹細胞内シグナル解析
- 腸管上皮幹細胞運命決定制御解析

3) 全身疾患における腸管上皮幹細胞異常機構解析と治療標的の探索

- 高効率上皮細胞移植モデルの構築
- 慢性疾患モデルマウスにおける腸管上皮幹細胞の機能異常解析
- 生活習慣病患者の腸管上皮幹細胞培養と上皮細胞異常機構解析

【期待される成果と意義】

近年、慢性消化管疾患のみならず糖尿病・高脂血症などの生活習慣病まで腸内細菌叢による腸管免疫・消化管ホルモンなど腸管上皮機能を介した病態が提唱されており、腸内環境の生体恒常性への関与が示唆されている。初代培養は小腸・大腸細胞共に管腔構造を維持することから、体外で腸内環境を直視できる優れた培養系である。本研究では腸管内の複雑な環境を生体外で疑似モデル化し経時的、可視的な解析系を構築することで腸管内の多様な因子の相互関係を明示できる。最終的には腸管上皮幹細胞からの細胞運命を人為的にコントロールすることで腸内環境のリセットを目標とし、種々の要因で陥った慢性疾患における悪性循環を断ち切ることが期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- 1) Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nature Medicine*18: 618-623, 2012.
- 2) Fordham RP, Yui S, Hannan NRF, Madgwick A, Vallier L, Pedersen RA, Nakamura T, Watanabe M, Jensen KB: Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell*. 13:734-744,2013.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度－30 年度
150,100 千円

【ホームページ等】

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 骨髄異形成症候群(MDS)の分子基盤の解明

京都大学・大学院医学研究科・教授 おがわ せいし
小川 誠司

研究課題番号：26221308 研究者番号：60292900

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨髄異形成症候群、RNA スプライシング、クローン進化

【研究の背景・目的】

骨髄異形成症候群(MDS)とその関連疾患は、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。その本質的な病因については、長く不明であったが、近年、全エクソンシーケンスによる申請者らの研究によって RNA スプライシング因子の系統的な変異が、本症に特異的かつ高頻度に認められることが明らかにされ、本症の病態の解明に大きな突破口が開かれている。そこで、本研究では、同研究成果およびこれに続く近年の申請者らの研究成果を踏まえて、RNA スプライシング因子の変異、および、それらと共存する遺伝子変異によって、MDS が発症し、さらに白血病への進展が生ずるメカニズムについて、世界トップレベルのゲノム解析技術とマウスモデルを駆使した遺伝学的・機能的解析を通じて明らかにすることにより、MDS の病態の理解とその克服に資することを目的とする。

【研究の方法】

①MDSにおける集団内多様性とクローン進化の解析
低リスク MDS から高リスク MDS、二次性白血病にいたる全経過で経時的に採取され、また詳細に分画された MDS 試料について、高深度の全エクソンシーケンスによる体細胞変異とそれらのアレル頻度を正確に決定することにより、腫瘍内の亜集団の構造を決定する。得られたデータを時系列で解析し、クローン進化の過程を描出することにより、RNA スプライシング変異その他のクローン進化における意義を明らかにする。また、MDS から進展した AML の症例で同意の得られる剖検例について、直接的な多数サンプリングを行い、これを全エクソンシーケンスによって解析することにより、MDS における空間的多様性について検討を行う。長期にわたって経時的に採取された再生不良性貧血(AA)の試料について、MDS 発症にいたる全過程について全エクソンおよび標的 deep sequencing によってクローン進化の過程を詳細に解析する。

②変異 RNA スプライシング因子の遺伝子標的の同定
60 例の MDS 由来 RNA の RNA sequencing により、変異スプライシング因子によってスプライシングの異常を受ける遺伝子群を網羅的に同定し、主要な変異スプライシング因子についてその標的となる遺伝子群を同定する。

③マウスモデルを用いた解析

主要な変異 RNA スプライシング因子(sf3b1, srsf2, u2af1 および zrsr2)に関して、これらの欠失アレルおよび機能獲得型アレルが正常造血機能およびクローン進化に及ぼす効果、また造血前駆細胞の RNA スプライシングに及ぼす効果を、マウスモデルを用いて解析する。

【期待される成果と意義】

本研究を通じて、

- 1) クローン進化の過程から MDS がどのようにして発症にいたるか、
 - 2) 他の造血器腫瘍との相違点は何か、
 - 3) この過程に関与する遺伝子変異、とくに RNA スプライシング因子の変異はどのような生物学的、分子論的な役割を演ずるのか、
- について明らかにすることができる。また、これらの知見は、MDS および骨髄系腫瘍の分子診断、治療法の改善に資すると期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- ・ Yoshida K, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478(7367):64-69. 2011
- ・ Kon A, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature genetics* 45(10):1232-1237. 2013
- ・ Makishima H, et al. Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nature genetics* 45(8):942-946. 2013
- ・ Haferlach T, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28(2):241-247. 2014

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度－30 年度
149,900 千円

【ホームページ等】

<http://www.genome.umin.jp>

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 造血幹細胞のホメオスターシスの維持と破綻

熊本大学・大学院先端機構・客員教授 **すだ としお**
須田 年生

研究課題番号: 26221309 研究者番号: 60118453

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 造血幹細胞、ニッチ、活性酸素、低酸素

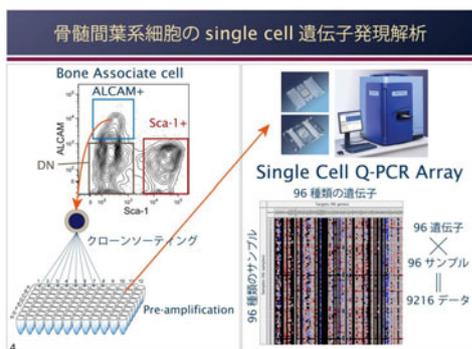
【研究の背景・目的】

幹細胞は、多方向に分化すると同時に未分化性を維持することのできる細胞である。造血幹細胞の増殖・分化は自律的に決定されるだけでなく、周囲の細胞や分子(ニッチ)によって制御されている。このニッチが幹細胞の運命にどのように関わるかを知ることは、幹細胞の恒常性を知る上できわめて重要である。本研究では、骨髄における造血幹細胞ニッチの構造を組織学的に再解析し、周辺細胞がいかなる分子機構で幹細胞を制御しているかを明らかにする。また、幹細胞はどのような機構で分裂を停止し、静止期を維持しているかを検討する。さらに、単細胞における遺伝子発現解析により幹細胞の分裂様式を解析し、幹細胞の属性である自己複製とその制御機構の解明に迫る。造血幹細胞における加齢に伴うDNA損傷の蓄積、ニッチ機能の劣化を通して、造血システムの恒常性の破綻を解析する。

【研究の方法】

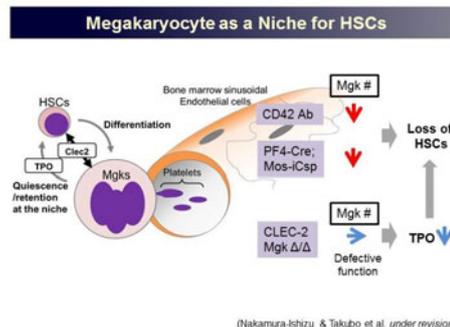
A) 造血幹細胞ニッチの解析: 骨髄造血ニッチの組織学構築を免疫染色や超微細形態観察を中心に解析する。ことに血管新生、造骨・破骨との関係で明らかにする。ニッチ細胞を分離し、幹細胞に作用するニッチ因子を同定し、その機能を解析する。また、低酸素性ニッチにある幹細胞の代謝学的特性を明らかにし、幹細胞がどのようにして未分化性を維持しているかを解明する。

B) 幹細胞ニッチの構築と制御: 上記の研究成果をもとに、ニッチ操作によって、幹細胞の静止期・分裂期を制御し、新たな骨髄移植技術を開発する。また一方、単離した幹細胞の分裂様式を microfluidics を用いた Single cell gene expression などにより解析し、ニッチが自己複製過程をいかに制御しているかを解明する。



【期待される成果と意義】

造血幹細胞のニッチとしては、未分化間葉系細胞、骨芽細胞、破骨細胞、および類洞構造という特徴をもつ血管内皮細胞が存在する。これらの細胞(巨核球、マクロファージなどの血液細胞を含む)と造血幹細胞の位置関係を免疫組織学、分子イメージングにより、生体内における幹細胞の動きを明らかにする。内骨膜ニッチを複数の細胞からなる複合体(Niche complex)と考え、その構成細胞・ニッチ分子の特性・機能を解明し、「幹細胞が幹細胞のままある」機構を明らかにする。また、造血ニッチを静的ではなく、発達・加齢に伴う動的なものとして捉える。骨髄造血の成熟に伴うニッチ制御機構の変化について、造血幹細胞の局在変化、ニッチ複合体の構成細胞の遺伝子発現とその造血支持能を解析し、DNA損傷を含む造血幹細胞の質的变化を規定する機構を解明する。これにより、年齢による造血機構の違い、さらには骨髄異形成症候群(MDS)にみられる造血機能の老化・不全の機構を明らかにする。



【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

Suda T, Takubo K, Semenza GL: Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9: 298-310, 2011

Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T: Tie2/Angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118: 149-161, 2004

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/celldiff/index.html>
sudato@z3.keio.jp

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 Runx2 遺伝子の転写制御機構の解明と、骨粗鬆症・変形性関節症治療薬の開発

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

こもり としひさ
小守 壽文

研究課題番号: 26221310 研究者番号: 00252677

研究分野: 形態系基礎歯科学

キーワード: 発現制御、発生・分化、創薬、細胞・組織、遺伝子

【研究の背景・目的】

Runx2 は、骨格形成に必要な転写因子であり、間葉系幹細胞より骨芽細胞分化に必須であること、Runx2 が軟骨細胞の後期分化に必須であること、Runx2 は関節軟骨等の永久軟骨の性格を失わせ、永久軟骨細胞を成熟させ軟骨基質を破壊する酵素を誘導する働きがあり、関節軟骨細胞の破壊によって発症する変形性関節症の原因遺伝子の一つであることを明らかにしてきた (図1)。したがって、Runx2 は

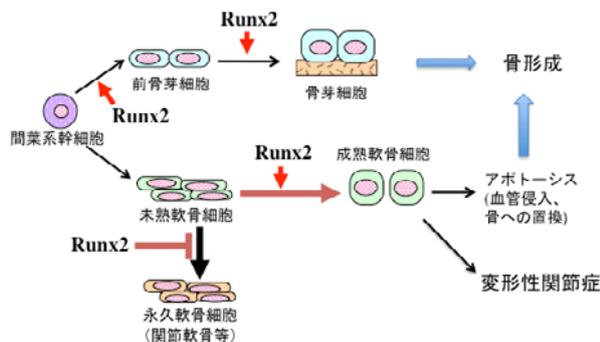


図1 Runx2の機能

骨に対しては正の作用、関節軟骨に対しては負の作用を持つ。Runx2 の骨芽細胞、軟骨細胞における発現調節機構の解明は、骨格形成・維持の分子機構の解明に画期的な進歩をもたらすと同時に、Runx2 発現を骨芽細胞・軟骨細胞で別個に調節できれば、骨粗鬆症や変形性関節症の治療薬の開発が可能になる。本研究では、Runx2 の骨芽細胞、軟骨細胞での発現制御機構を明らかにし、その分子機序をもとに骨粗鬆症および変形性関節症の治療薬候補を同定する。

【研究の方法】

Runx2 遺伝子ゲノム領域を含むレポーターマウスを用いて、骨芽細胞、軟骨細胞での発現を規定している領域を特定する。次に、特定した領域を用いたレポーターマウスを作製し、骨芽細胞、軟骨細胞に発現に必要な最小領域 (エンハンサー領域) を決める。次に、これらの発現制御領域を活性化する分子群を同定し、エンハンサーに結合する複合体の全容を解明する。Runx2 を骨芽細胞前駆細胞で発現誘導する化合物は、骨芽細胞を増加させ、骨粗鬆症の治療薬となる。一方、軟骨細胞で Runx2 の発現を抑制する化合物は、軟骨の破壊を抑制し、変形性関節症の治療薬となる (図2)。したがって、化合物スクリ

ーニングによって、Runx2 の骨芽細胞特異的エンハンサーを活性化、Runx2 の軟骨細胞特異的エンハンサーを抑制する化合物を同定し、動物実験でその効果を実証する。

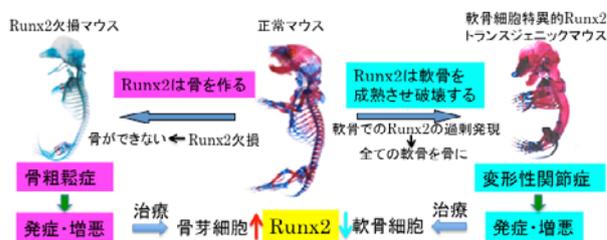


図2 Runx2の発現制御による骨粗鬆症、変形性関節症治療薬の開発

【期待される成果と意義】

Runx2 は骨格形成において中心的な役割を果たす分子であり、その発現制御機構の解明は、骨格形成機構の理解を格段に深める。また、国内でも骨粗鬆症患者は 1280 万人、膝の変形性関節症患者は 2540 万人と推定されている。本研究は、エンハンサーを用いた化合物スクリーニングにより、骨形成促進薬や変形性関節症治療薬を開発するものであり、大きな社会貢献が期待できる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Kawane T, Komori H, (10 authors), and Komori T. Dlx5 and Mef2 Regulate a Novel Runx2 Enhancer for Osteoblast-Specific Expression. J Bone Miner Res. 2014 Apr 1. doi: 10.1002/jbmr.2240. [Epub ahead of print]
- Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. J Cell Biochem. 112 (3): 750-755, 2011.

【研究期間と研究経費】

平成 26 年度 - 30 年度
150,000 千円

【ホームページ等】

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/kaibou-2/index.html>

【基盤研究(S)】

生物系 (医歯薬学)



研究課題名 低分子オステオリプログラミングとそのゲノム基盤の解明に基づく新規骨再生技術の創生

東京大学・医学部附属病院・教授 **たかと つよし**
高戸 毅

研究課題番号：26221311 研究者番号：90171454

研究分野：外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般、骨再生

【研究の背景・目的】

申請者らが見出してきたダイレトリプログラミング、骨形成性低分子化合物群に関する知識を集約させることで、低分子化合物による骨芽細胞へのダイレトリプログラミング法を「低分子オステオリプログラミング」として新たに提唱し、申請者らが取り組んできた骨再生用担体と組み合わせることで新しい骨再生医療戦略へとつなげることが目的である。低分子化合物のみを用いた骨芽細胞へのダイレトリプログラミング法の開発と生体内への応用のための適切な担体の選択と検証・再生メカニズムの解明までを包括的に行うことで、安全かつ効率的な低分子オステオリプログラミングによる骨再生医療のための基盤技術を開発する。さらに、ゲノムワイド大規模解析によるリプログラミングメカニズムの探求を通じて、これまでとは異なる切り口から骨芽細胞分化過程のエピジェネティックな理解へつなげたいと考えている(図1)。

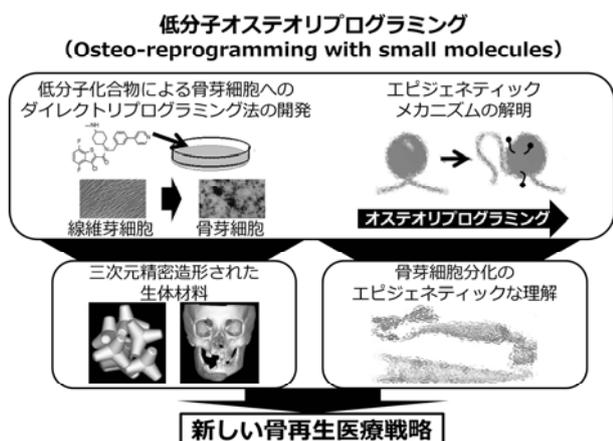


図1：研究概要

【研究の方法】

1. 低分子オステオリプログラミング法の開発

線維芽細胞のオステオリプログラミングを誘導する低分子化合物の組み合わせとその処理条件を同定する。骨形成性シグナル経路調節剤と、エピゲノム調節剤の併用の可能性についても検証する。マウス細胞における最適化の後に、ヒト細胞においてリプログラミングプロトコルを検証する。

2. 低分子オステオリプログラミング法のエピジェネティックメカニズムの解析

ヒト線維芽細胞の低分子オステオリプログラミング過程におけるエピゲノム状態と遺伝子発現の変化

をゲノムワイドで追跡し、その分子基盤と作製した細胞の性状をエピジェネティクスの観点から明らかにする。

3. 低分子オステオリプログラミングによる骨再生効果と再生メカニズムの検証

低分子オステオリプログラミングにより作製した線維芽細胞由来骨芽細胞による骨再生効果とその再生メカニズムを各種モデル動物において検証する。

【期待される成果と意義】

低分子化合物によるダイレトリプログラミングに基づく骨再生法の包括的な開発は世界初の試みである。ダイレトリプログラミングに基づいた三次元骨組織の開発についても前例はなく、本研究が新たな骨再生医療戦略の試金石となる可能性を大いに秘めている。骨芽細胞へのリプログラミング過程におけるメカニズムをエピジェネティクスの観点から明らかにすることにより、治療法の開発のみならず骨生物学への貢献も期待できる。このように、応用研究と基礎研究が一つのプロジェクト内で有機的に作用し合うことで、新たな医療戦略のみならず新しい学問領域の醸成の布石となることも期待される。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

- Kanke K, Takato T et al. Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into osteoblasts using four small molecules under serum-free and feeder-free conditions. *Stem Cell Rep* 2:751, 2014
- Saijo H, Takato T et al. A novel method for designing and fabricating custom-made artificial bones. *Int J Oral Maxillofac Surg* 40:955, 2011
- Ohba S, Takato T et al. Identification of a potent combination of osteogenic genes for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J* 21(8):1777, 2007

【研究期間と研究経費】

平成26年度～30年度
136,100千円

【ホームページ等】

<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

