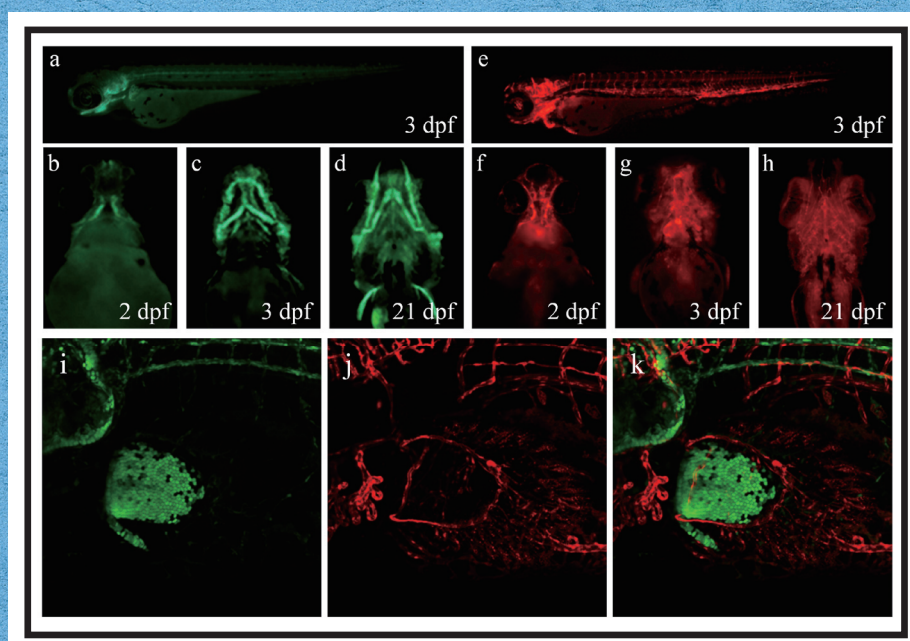


京都大学

## 再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences  
Kyoto University

〈第15巻〉

2012  
平成24年



#### 表紙写真

「蛍光イメージングにより軟骨および血管を可視化した  
トランスジェニックゼブラフィッシュ」

(a-d) *col2a1 : GFP* の生後2日目(b), 3日目(a, c), 21日目(d)におけるEGFPの発現. 頭部の軟骨や胸ヒレの軟骨において強いEGFPの発現が認められる. (e-h) *flkl : mCherry* の2日目(f), 3日目(e, g), 21日目(h)におけるmCherryの発現. (i-k) 共焦点レーザー顕微鏡により観察した *col2a1 : GFP ; flkl : mCherry* (10 dpf) の胸ヒレにおけるEGFP(i)およびmCherry(j)の発現(Z-projection). EGFPは軟骨の, mCherryは血管の場所をそれぞれ示している. 各々の画像を重ね合わせることで, 軟骨と血管網の関係が可視化される(k).



## 目 次

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 1. 巻 頭 言 .....                       | 1   |
| 2. 京都大学再生医科学研究所概要                    |     |
| 2-1 沿 革 .....                        | 2   |
| 2-2 教員数等 .....                       | 2   |
| (1) 教 員 .....                        | 2   |
| (2) 大学院生・研修員・研究生等 .....              | 2   |
| 2-3 組 織 図 .....                      | 3   |
| 3. 研究概要と研究業績                         |     |
| 生 体 機 能 学 研 究 部 門                    |     |
| 細胞機能調節学分野 (准教授 細川 暢子) .....          | 4   |
| 生体機能調節学分野 (客員教授 坂口 志文) .....         | 12  |
| 生体システム制御学分野 (教 授 長澤 丘司) .....        | 18  |
| 生 体 組 織 工 学 研 究 部 門                  |     |
| 生体分子設計学分野 (教 授 開 祐司) .....           | 23  |
| 生体材料学分野 (教 授 田畑 泰彦) .....            | 30  |
| 組織修復材料学分野 (教 授 岩田 博夫) .....          | 52  |
| 生体物性学分野 (客員教授 佐藤 正明) .....           | 58  |
| 再 生 統 御 学 研 究 部 門                    |     |
| 再生増殖制御学分野 (教 授 瀬原 淳子) .....          | 68  |
| 再生免疫学分野 (教 授 河本 宏) .....             | 75  |
| 再 生 医 学 応 用 研 究 部 門                  |     |
| 生体修復応用分野 (教 授 高橋 淳) .....            | 78  |
| 組織再生応用分野 (教 授 戸口田淳也) .....           | 84  |
| 器官形成応用分野 (准教授 角 昭一郎) .....           | 92  |
| 臓器再建応用分野 (准教授 中村 達雄) .....           | 96  |
| 幹 細 胞 研 究 部 門                        |     |
| 発生分化研究分野 (教 授 中辻 憲夫) .....           | 104 |
| 胚性幹細胞研究分野 (准教授 末盛 博文) .....          | 109 |
| 幹細胞分化制御研究分野 (教 授 山下 潤) .....         | 114 |
| 幹細胞加工研究分野 (准教授 多田 高) .....           | 123 |
| 附 属 再 生 実 験 動 物 施 設 (准教授 近藤 玄) ..... | 127 |
| 附 属 ナ ノ 再 生 医 工 学 研 究 セ ン タ ー        |     |
| ナノバイオプロセス研究領域 (教 授 楠見 明弘) .....      | 131 |
| シミュレーション医工学研究領域 (准教授 玄 丞休) .....     | 136 |
| ナノバイオメカニクス研究領域 (助 教 都賀谷紀宏) .....     | 143 |
| バイオメカニクス研究領域 (教 授 安達 泰治) .....       | 145 |
| 技 術 部 .....                          | 154 |
| 4. 学 術 集 会 .....                     | 155 |
| 5. 共 同 研 究 .....                     | 161 |
| 6. 協議員・教職員・その他構成員名簿 .....            | 172 |







# 1. 巻 頭 言

## びっくりする

“びっくりする”ためにはそれなりの心の準備が必要です。2012年度ノーベル生理学・医学賞が山中伸弥教授に授与されました。喜びに堪えないところです。山中先生が再生医科学研究所に所属されていたときに報告された論文がその受賞の主たる業績であったこともあり、2012年度の再生医科学研究所の学術講演会での所長挨拶でこのすばらしい出来事について言及しました。しかし、最後に私の本音が思わず出てしまい「専門外の私は山中先生のお仕事のすばらしさをよく理解していると思えません。」と言ってしまいました。多くの方特に若手の所員方は「こんなおじさんに再生医科学研究所の所長を任せておいていいのか」と思われたそうです。

いろいろ教えてくださる方がいて、山中先生のお仕事は「個体発生時の時間の流れの巻き戻しが可能である(可逆)」ことを示した、すなわち、生物学の一つの大きな常識を覆した極めて重要なお仕事だそうです。可逆・不可逆といえばエントロピーの増大法則を思いつきます。Boltzmann は、1877年に下記の極めて簡単な式を提出しました。

$$S = k_B \ln W$$

ここで  $S$  エントロピー、 $k_B$  は Boltzmann 定数、 $W$  はある 1 つの巨視的状态に対応した微視的状态の数、 $\ln W$  はその数の自然対数です。この式の素晴らしさは、等身大の世界の物理量(熱力学)として定義されてきたエントロピー  $S$  をミクロな世界の微視的状态の数  $W$  に結びつけ、また、「分子の世界を支配する力学系は可逆であるが、等身大の世界は不可逆である(覆水盆に返らず)」の矛盾を説明したことであろうか。わたしは、学生時代は、例題として出された問題に Boltzmann の式を適用してエントロピーを計算して“○”をもらって満足していました。研究領域の関係で十年に一度ほどしかこの式のお世話にならないのですが、それでも使うたびごとに異なる側面に気がついて、この簡単な式が驚くべき式であることが徐々にわかってきました。理解が深まるとともに驚きも大きくなりました。

さて、もう一度山中先生のお仕事ですが、私のような生物学の素人は「クローンニンジンが出来るのだから……」とさほど驚かない、すなわち驚くことができないのだと思います。動物の生物学や医学領域の研究者、それも深く学んだ研究者であればあるほど、山中先生のお仕事が発表されたときに驚かれたと思います。若い研究者が一度集まって「山中先生のお仕事」の何に驚いたかを話されてはいかがでしょうか。立派な仕事ほどそれぞれの方が異なる側面で驚くものです。身の丈に合った驚きしか得られないと思います。

大学構内ですれ違うこともある身近な先生が一大仕事をされました。学生また若い研究者は“私もひょっとして……”と思い、是非大きな問題に挑戦してください。再生医科学研究所から第二第三の山中先生が生まれることを期待しています。

再生医科学研究所長 岩田 博夫

## 2. 京都大学再生医科学研究所概要

### 2-1 沿革

本研究所は、平成10年4月9日に設置された。その前身である胸部疾患研究所は、昭和16年3月に「結核の予防及び治療」を主軸とする結核研究所として設置され、昭和42年6月には結核胸部疾患研究所に名称変更、さらに昭和63年4月には「胸部疾患に関する学理及びその応用の研究」を目的とした胸部疾患研究所への全面改組が行われた。一方、生体医療工学研究センターは、昭和55年4月に「医療に用いる新素材の開発及び新素材を用いた新しい診断と治療」へと研究範囲を広げた生体医療工学研究センターに改組された。胸部疾患に関する研究・治療を取り巻く社会的要請の変化から、胸部疾患研究所は57年間にわたる使命を終え、平成10年度より、同研究所基礎系分野及び臨床系分野の一部と生体医療工学研究センターの全分野とが統合し、さらに実地臨床医学を行う医学研究科との協力により、「生体組織及び臓器の再生に関する学理及びその応用の研究」を目的とする再生医科学研究所に全面改組された。

全面改組に伴い、胸部疾患研究所の臨床系分野の一部と研究所附属病院は、大学院医学研究科・医学部並びに医学部附属病院へとそれぞれ引き継がれた。

本研究所は、平成10年4月の発足時は5大研究部門と附属再生実験動物施設で組織された。その後、平成14年4月に附属幹細胞医学研究センターが設置され、平成16年4月に研究部門の再編(1大研究部門減)の実施によりナノ再生医工学研究センターが設置された。平成16年10月には、住友電気工業(株)の寄附による寄附研究部門が4年間の時限で設置された。平成24年4月に幹細胞医学研究センターを改組し、幹細胞研究部門が設置された。現在5大研究部門(生体機能学、生体組織工学、再生統御学、再生医学応用、幹細胞)、2附属施設となっている。平成17年10月から平成22年3月まで、工学研究科、医学研究科とともに、ナノメディシン融合教育ユニットに参加した。平成24年度からは博士課程教育リーディングプログラム「充実した健康長寿社会を築く総合医療開発リーダー育成プログラム」に参加している。

本研究所は、生命科学、医学、工学などの研究所が結集して再生医学の学際的基礎研究を推し進め、その成果の医学応用をめざすとともに、ヒトES細胞株の樹立機関として、樹立・特性解析を行ったES細胞を、全国の研究機関へ分配するナショナルバイオリソース事業を実施している。

また平成20年10月には共同利用・共同研究拠点の認定を文部科学大臣より受け、再生医学・再生医療に関する共同研究を実施している。

主な建物は、再生医科学研究所西館、再生医科学研究所東館(旧生体医療工学研究センター)、幹細胞医学研究棟(平成14年施工、平成24年名称変更)、南部総合研究実験棟(ウイルス研、医学研究科との3部局合同使用)(平成14年施工)の4棟となっている。

### 2-2 教員数等

#### (1) 教 員 (平成25年1月1日現在)

| 現 員 | 教 授   | 准教授   | 講 師 | 助 教 | 小 計   | 特任講師 | 特任助教 | 合 計   |
|-----|-------|-------|-----|-----|-------|------|------|-------|
|     | 10(3) | 10(1) | 2   | 8   | 30(4) | 1    | 1    | 32(4) |

( ) 内は客員で外数

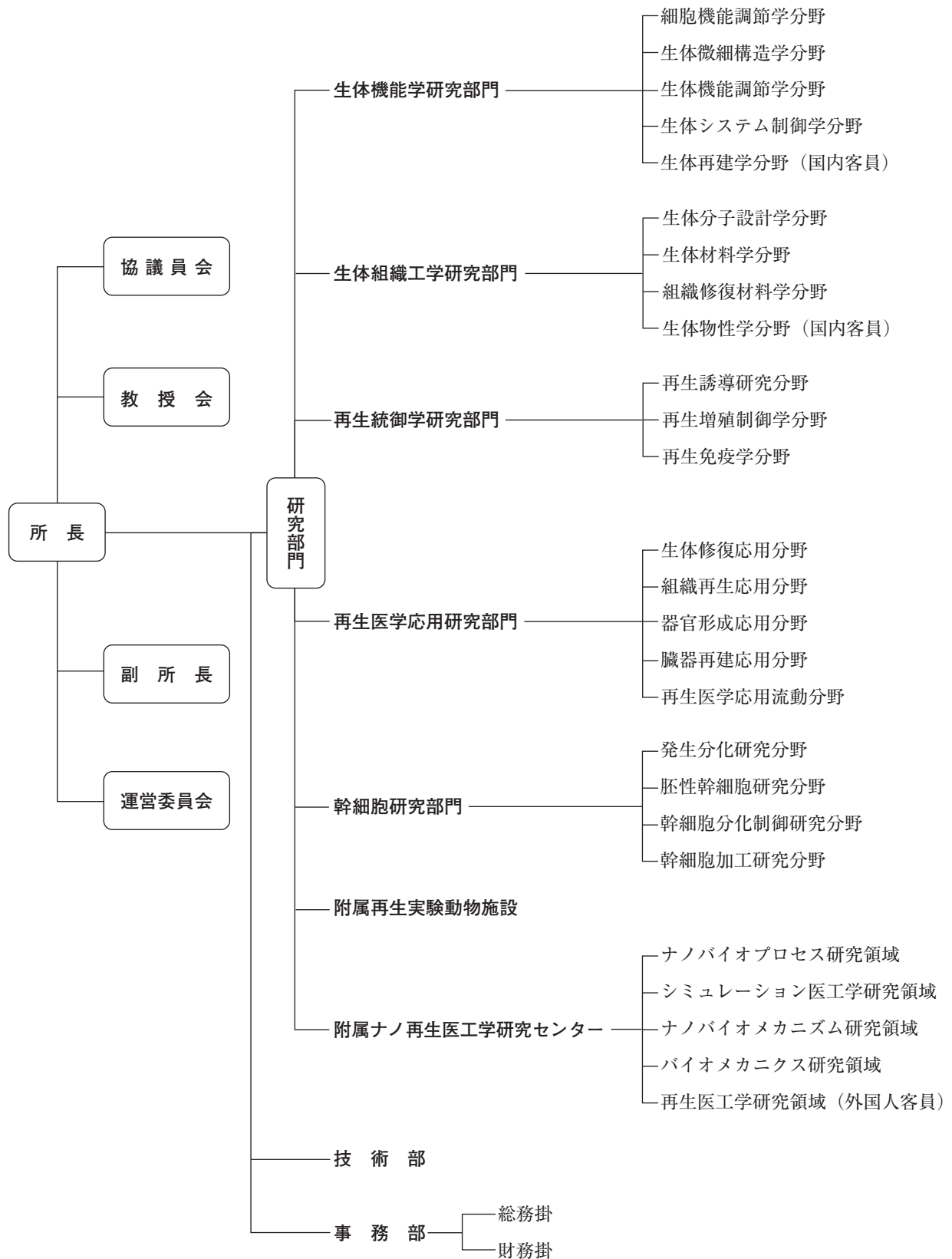
#### (2) 大学院生・研修員・研究生等 (平成25年1月1日現在)

| 大 学 院 生 | 研 修 員 | 研 究 生 | 外国人共同研究者等 |
|---------|-------|-------|-----------|
| 87      | 5     | 8     | 5         |



## 2-3 組織図

(平成 25 年 1 月 1 日現在)



### 3. 研究概要と研究業績

#### 生体機能学研究部門

##### 細胞機能調節学分野

##### Department of Molecular and Cellular Biology

准教授 細川 暢子

Assoc. Prof. Nobuko Hosokawa

#### 【研究概要】

細胞機能調節学分野では、以下の4つのグループで研究を進めている。

#### 1. タンパク質の生合成・再生・品質管理機構の研究

細胞内で生合成されたタンパク質は、正しい高次構造を取ってはじめて機能することができる。タンパク質が正しい高次構造を形成するためには、分子シャペロンタンパク質の介助が必要であること、また生合成の過程でしばしばタンパク質は高次構造形成に失敗する事が明らかになってきた。ミスフォールドしたタンパク質は、再度フォールディング・サイクルに入るか、場合によっては細胞内分解される必要がある。このように、正しい高次構造をもったタンパク質を生合成・再生し、ミスフォールドしたタンパク質を処理するメカニズムは、タンパク質の品質管理機構と呼ばれている。小胞体では、多くの分泌タンパク質や膜タンパク質の生合成が行われており、これらのタンパク質の高次構造形成は小胞体品質管理機構(ERQC: endoplasmic reticulum quality control)によって担われている。小胞体内でミスフォールドしたタンパク質はサイトゾルへ引き出された後、ユビキチン-プロテアソーム系で分解され、この機構は小胞体関連分解(ERAD: endoplasmic reticulum-associated degradation)と呼ばれている。私たちは、ERQC および ERAD の作用機序の解明を、細胞、分子ならびに個体レベルで行っている。このメカニズムは、遺伝子レベルで変異をもったタンパク質が ERAD 機構によって分解されたり、あるいは ERQC の破綻が糖尿病や神経変性疾患などさまざまな疾患を引き起こすことが明らかにされ、病態解明や疾病治療の面からも注目されている。また、小胞体で生合成されるタンパク質の多くは N 結合型糖鎖をもった糖タンパク質であり、従って小胞体品質管理においては、糖鎖のトリミングと、特定の構造をもった糖鎖を認識するレクチンが、タンパク質のフォールディングや分解を制御することが知られている。

私たちは、哺乳類小胞体に存在する分子シャペロンタンパク質やレクチン、酵素、小胞体膜上に存在するユビキチンリガーゼ複合体などのタンパク質品質管理に関わる分子を中心に研究を進めている。

哺乳類の小胞体では、翻訳と同時に14個の糖からなるN-グリカンが付加される(図1)。生合成の後、直ちに3つのグルコースおよび数個のマンノースのトリミングが行われ、小胞体に存在するレクチンはそれぞれの糖鎖構造を認識して結合する。この糖鎖のプロセッシングとレクチンによる認識を介して、生合成された糖タンパク質や変性したタンパク質の品質管理、すなわちフォールディング、再生、分解が制御されている。本年度、私たちは、新規小胞体レクチン XTP3-B が、細胞の中でマンノースを9つ持った糖鎖(M9糖鎖)を認識して結合し、糖タンパク質の分解を抑制することを明らかにした。また、哺乳類細胞には、小胞体関連分解を促進する EDEM タンパク質(endoplasmic reticulum degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein)が3つ存在する。私たちは、その1つ



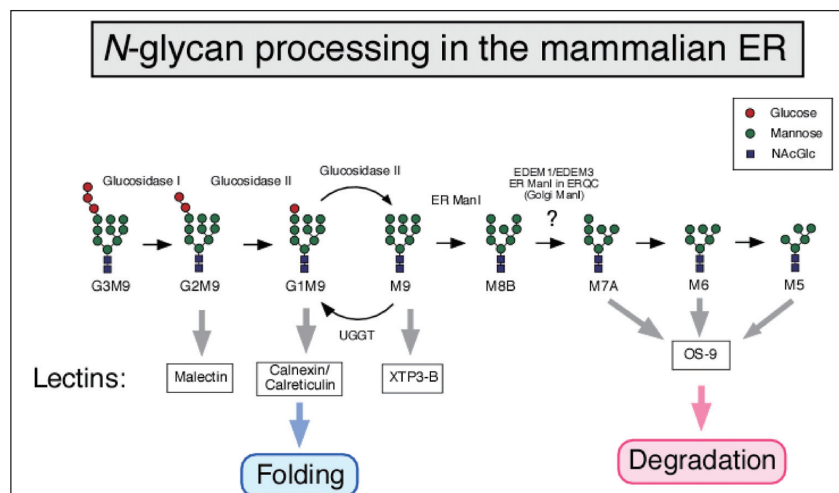


図1 哺乳類小胞体膜におけるN-グリカンプロセッシング

哺乳類小胞体で生成された糖タンパク質は、生成と同時に14個の糖からなるN-グリカンが付加される。その後直ちに末端からグルコースとマンノースのトリミングが進行する。小胞体中存在するレクチンはこれらの糖鎖構造を特異的に認識して結合し、糖タンパク質のフォールディングや分解を制御している。

Figure1 N-glycan processing in the mammalian ER

Glycoproteins synthesized in the mammalian ER co-translationally accept N-linked oligosaccharides consisting of 14 sugars. However, immediately after the addition of N-glycans, glucose and mannose trimming proceeds within the ER. ER lectins recognize and bind to each N-glycan structure and regulate the folding and degradation of glycoproteins.

EDEM3が、細胞内でマンノースをトリミングする酵素活性を示すことを示したが、*in vitro*での酵素活性、特異性については明らかにされていない。*in vitro*での酵素活性を明らかにすることで、小胞体におけるマンノーストリミングの制御と糖タンパク質分解メカニズムの解明に取り組んでいる。また、小胞体ストレスによって発現が誘導されてくる遺伝子の解析を行って新規シャペロンタンパク質を同定したので、その機能解析も進めている。

(文責：細川暢子 准教授)

## 2. タンパク質の折りたたみの不思議をとことん追求する

タンパク質の正しい折りたたみとは何か、このシンプルな疑問を追求する事で、タンパク質構造の構築原理、小胞体内のタンパク質品質管理機構、タンパク質の凝集体形成の平衡とその疾患への関わりを明らかにして行きたいと考えています。その材料はセルピンという、バクテリアからヒトまで3000種類以上も存在する我々に非常に身近なスーパーファミリータンパク質です。

セルピンとは Serine Protease Inhibitors の略称であり、その基本機能は名前が示す通りセリンプロテアーゼを阻害する事であり、実に緻密に我々の生命現象を調節しています(ヒトでは33種類の存在が現在判明)。代表例は、炎症時に活発に分泌される好中球エラスターゼから肺を護るアンチトリプシン、血液凝固のバランスを絶妙に操るアンチトロンビンです。セルピンの機能はそれだけではありません。進化の過程でどのような精錬があったかは未だに謎ですが、セリンプロテアーゼを阻害できないにもかかわらず、我々の生命活動に非常に重要な機能をもつセルピンが多数存在します。例えば、ガン細胞の分化に関わるマスピン、コラーゲンのモデリングに必須なHSP47、血圧を調節するアンジオテンシンペプチドの前駆体アンジオテンシノーゲン、我々の食生活に欠かせない鶏卵の代表タンパク質オボアルブミンなどです。ここで非常に興味深い事実はすべてのセルピンが同じ姿形をしていることです(図2右上の構造を参照)。一体このセルピンの構造にはタンパク質としてどのような利点があるために、これほど生命の細胞内・外で採用されて来たのでしょうか？その疑問を明らかにできる一つの手がかりが家族性変異を原因として起こるセルピンの凝集とその疾患にあると私は考えています。

近年研究対象として来たアンチトリプシン欠損症は、遺伝性タンパク質凝集疾患の一つとして特に欧米で患者が

多く(有名な Z 変異は 4% が heterozygote, 0.1% が homozygote で保持), 肝臓疾患や肺気腫の発症に関する早急な疾病メカニズムの解明, 治療法の開発が待たれています. アンチトリプシン凝集体形成機構について, X 線結晶構造解析をベースとし検討を行なったところ, アンチトリプシンは単一のタンパク質でありながら, 条件によって図 2 に示したような 2 種類の凝集メカニズムが可能であることが明らかとなりました(Polymer A: 分子中央の構造モチーフが隣の分子に挿入, Polymer B: 分子 C 末が挿入). 各分子はまるでパズルを完成するごとく, その分子構造の一部を隣の分子と共有することで規則正しい凝集体形成を実現しており, これは現在までの漠然としたタンパク質凝集のイメージ, 例えば「異常な」と称される, とはずいぶん異なるものでした. さらに明らかになった事は, B の凝集体が, 実際の肝硬変を引き起こした患者の細胞内凝集体に蓄積していた事, そしてアンチトリプシンはこの 2 つのメカニズムだけでなく, さらなるメカニズムで凝集することです. 得られた構造をベースに肝硬変を防止する薬剤のスクリーニングを現在行なっています. そして, 一体, 我々の細胞はどのようにタンパク質凝集体と言う毒を見分けることができるのかを追跡しています. この疑問は, タンパク質がタンパク質を認識するという生命現象の根幹定理を問うだけでなく, タンパク質の毒が我々に備わった恒常的な監視システムをいかに騙し疾患へと導く事ができるのかを問うものです. そして得られる情報のすべてが我々の生命現象におけるセルピン構造の重要性を示唆します.

(文責: 山崎正幸 特定准教授(白眉)(兼任 白眉センター))

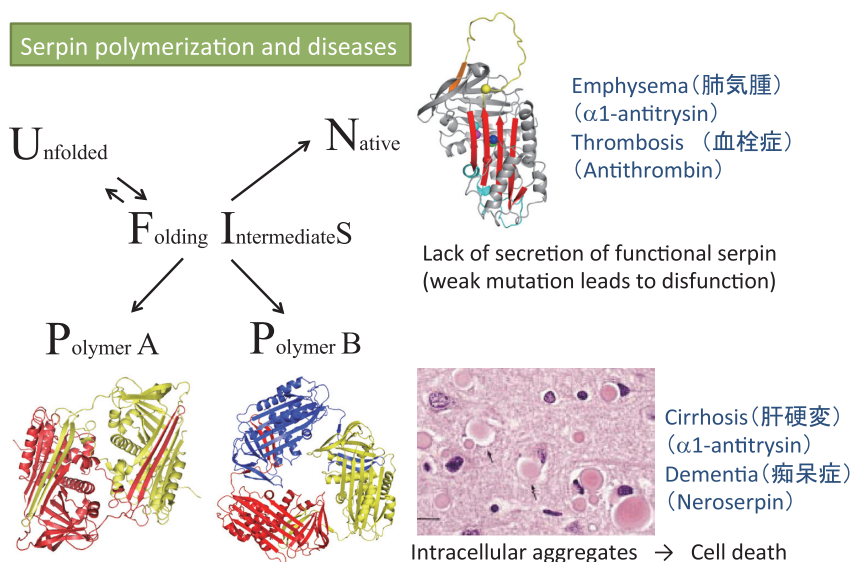


図 2 セルピン (Serine Protease Inhibitors) の凝集とそれにより引き起こされる疾患  
 バクテリアからヒトまで約 3000 種類も存在するスーパーファミリータンパク質であるセルピンは, 家族変異が原因で小胞体内において複数のメカニズムで凝集をする. 凝集体の一つは細胞内で封入体を形成し, 肝臓疾患や痴呆症を引き起こす (Gain of function). また正常な構造と機能を持ったセルピンが十分に分泌されないことで, 肺気腫や血栓症が引き起こされる (Loss of function).

**Figure2 Serpin (Serine Protease Inhibitors) polymerizations and related diseases**  
 Serpin superfamily includes ~3000 proteins from bacteria to human. Their familial mutations result in intracellular aggregation by the multiple mechanisms. One of the aggregates seems to be incorporated into cellular inclusions, leading to cirrhosis, dementia, and etc (Gain of function). While, the intracellular aggregation results in the lack of secretion of serpins, leading to emphysema, thrombosis, and etc (Loss of function).

### 3. 基本転写機構の解析と RNA aptamer の応用に関する研究

ショウジョウバエのクロマチンリモデリングに参与する GAGA 因子の転写における機能について解析を進めている. 今年度は, 転写そのものとは無関係と思われていた GAGA 因子が, 転写複合体中に含まれ, 基本転写因子と結合していることを明らかにした. クロマチンリモデリングに参与する因子の新しい機能を示唆するものである. 本研究には, RNA が取り得る立体構造を応用する RNA アプタマーを, 解析ツールとして使用している. この分

子の活用方法として、異なる結合領域を持つアプタマーを一つの分子として機能させることにより、抗体とは異なるユニークな活用方法を示した。この方法は、細胞内で、本来結合することができない分子を任意に結合させることができる。この分子を用いれば、人工的な複合体を細胞内で構築することも可能になる。また、RNA を利用した分子故に、生体内では一定時間で分解される。これらの特徴を生かし、必要なときにのみ働く、副作用の少ない薬剤として活用することも可能であり、近年注目されている抗体医薬と同等あるいはそれ以上の機能が期待される。RNA アプタマーの活用方法を模索している。（文責：平芳一法 講師）

#### 4. 低頻度ながら正常マウス胸腺より検出される異常な TCR $\beta$ 鎖遺伝子 V(D)J 組換え、ハイブリッド・ジョイント、の研究

V(D)J 組換えは、V, D, J セグメントに付随する組換えシグナル配列にまず RAG タンパクが結合し切断することで開始される。RAG タンパクによる切断で、ヘアピン構造を有するコーディング末端とシグナル末端がそれぞれ2つずつ生じる。次に非相同的 DNA 末端結合機構により、通常、2つのコーディング末端同士がつながられコーディング・ジョイントとなる。同時に、2つのシグナル末端同士がつながられシグナル・ジョイントとなる。まれにコーディング末端とシグナル末端がつながったハイブリッド・ジョイントが形成されることがある(図3)。しかしながら、正常マウス胸腺の TCR $\beta$  鎖遺伝子 V(D)J 組換えにおけるハイブリッド・ジョイント形成に関しては、これまで報告されていない。われわれは本研究で、低い頻度ながら PCR で TCR $\beta$  鎖遺伝子 D-J 組換えに伴うハイブリッド・ジョイントを正常マウス胸腺から検出した。

非相同的 DNA 末端結合機構で重要な役割を果たしている ATM(ataxia-telangiectasia mutated)タンパクを欠くと、リンパ腫の発生率が上昇することがよく知られている。このとき、ハイブリッド・ジョイントが形成されやすくなることも報告されている。今後われわれはまず ATM<sup>-/-</sup>マウス胸腺において、TCR $\beta$  鎖遺伝子 D-J 組換えに伴うハイブリッド・ジョイント形成の頻度を明らかにする予定である。（文責：藤本真慈 助教）

In order to detect hybrid joining we used 3' D2 primer instead of 5' D2 primer

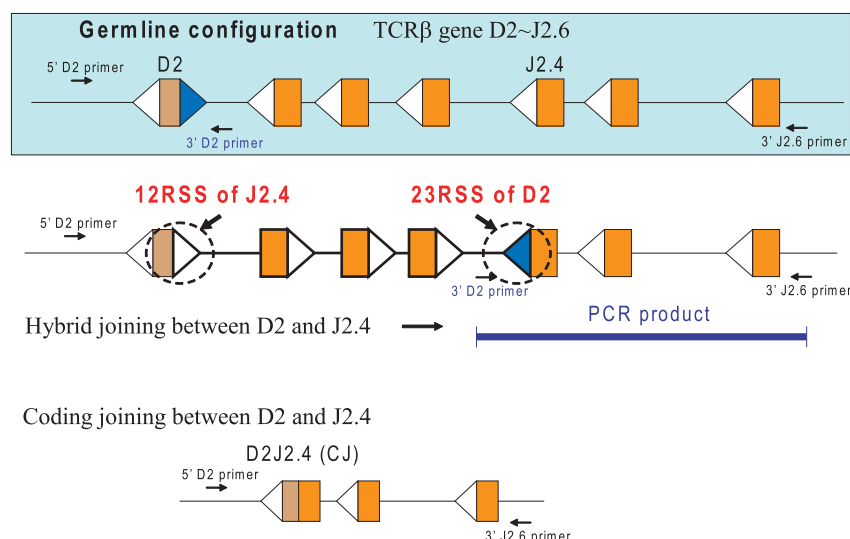


図3 TCR $\beta$  鎖遺伝子 D-J 組換えに伴うハイブリッド・ジョイントとハイブリッド・ジョイントを PCR で検出する方法

例として、D2 と J2.4 の間で生じたハイブリッド・ジョイントを示す。コーディング・ジョイント検出用のプライマー(5' D2 primer と 3' J2.6 primer)では、ハイブリッド・ジョイントを増幅することができない。

Figure3 Hybrid joint formation during TCR $\beta$  gene D to J rearrangement and detecting the hybrid joint by PCR

A hybrid joint between D2 and J2.4 is shown as an example. The primer set (5' D2 primer and 3' J2.6 primer) for detecting coding joints cannot amplify hybrid joints.



Department of Molecular and Cellular Biology consists of the following four groups.

### **1. Regulation and function of molecular chaperones/stress proteins and lectins, and the mechanism of protein quality control.**

Newly synthesized proteins obtain their native conformations by the assistance of molecular chaperones. However, the process of protein folding is error-prone, and polypeptides that failed to obtain native structures enter the refolding cycle or are subjected to intracellular protein degradation. Many secretory proteins and membrane proteins are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER), and their folding is regulated by the ER quality control (ERQC) mechanism. Terminally misfolded polypeptides in the ER are degraded by the cytoplasmic proteasomes after retrotanslocation through the ER membrane, a mechanism known as ER-associated degradation (ERAD). Many works have clarified the importance of ERAD of misfolded proteins and the disruption of ERQC in genetic diseases, neurodegenerative disorders, and diabetes mellitus. Since most of the proteins synthesized in the ER are *N*-glycosylated, ERQC of glycoproteins are regulated by the processing of the *N*-glycans and the recognition of specific sugar structures by the lectins.

We have recently clarified that an ER lectin named as XTP3-B recognizes M9 glycans in the ER, and protects glycoproteins bearing M9 glycans from premature degradation. Mammalian EDEMs (ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like proteins) have three members, and we have reported that EDEM3 has a processing  $\alpha$ -mannosidase activity in the cell. However, enzyme activity of EDEM3 *in vitro* remained elusive. We are analyzing the mannose-processing activity of EDEM3 *in vitro* to clarify the mechanism of ERQC that depends on the mannose processing of glycoproteins. Also, we are studying the function of genes that are upregulated by ER stress, and now focusing on proteins that have characteristics of possible new chaperones. (by N. Hosokawa)

### **2. A challenge for how a protein folds**

What is a proper protein folding that can function properly? By just seriously looking for the answer to this simple question, I believe I will be able to investigate (1) the basis for protein folding (2) the protein quality control in endoplasmic reticulum (3) the equilibrium of the formation of intracellular protein aggregation, leading to diseases. The present material for my study is called as “Serpín”, which are Serine Protease Inhibitors superfamily proteins widespread exists in our world from bacteria to human (~3000 species).

The basic function of serpin is to inhibit serine proteases as the name tells. They very well regulate our life; for example,  $\alpha_1$ -antitrypsin protects our lung from neutrophil elastase that is produced on inflammatory response, antithrombin almost dominates our blood clotting reactions. Moreover, serpin has other physiologically important functions apart from its potent role that can inhibit serine proteases, although the reason is not known well. Maspín is a key factor for cancer cell proliferation, HSP47 can model collagens, Angiotensinogen contains angiotensin peptide, and ovalbumin is major protein in egg white. A big interest here is all serpin superfamily proteins have same structure (See the figure). Why is this structure employed so much extent? What is this advantage? I thought a clue for this question may be to investigate the serpin polymerizations and their related diseases caused by familial mutations.

The recent project has been on an underlying molecular mechanism for the  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency that is very popular as one of the protein aggregation related diseases especially in North Europe (4% is heterozygote and

0.1% is homozygote in Caucasian) and would be applicable to prevent or treat this deficiency.  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency is typically characterized by the intracellular deposition of the  $\alpha_1$ -antitrypsin aggregates and inclusion bodies in patient hepatocyte. This seems to be a direct cause for the juvenile cirrhosis and alternatively the emphysema due to the lack of the secreted  $\alpha_1$ -antitrypsin in plasma that inhibits a neutrophil elastase. It was first examined how  $\alpha_1$ -antitrypsin can polymerize *in vitro* on the basis of X-ray crystallographic techniques. It seemed  $\alpha_1$ -antitrypsin can polymerize via two distinct mechanisms depends on conditions, but both occur structurally in a very similar manner; polymer A uses the motif in the central  $\beta$ -sheet A for molecular linkage and polymer B uses in the C-terminal part of the molecule. Moreover, the structure of the polymer very resembles to the native monomer conformation of  $\alpha_1$ -antitrypsin, which was indeed a surprise for us contrary to the general picture we had about the way of protein aggregation like "abnormal". Importantly, it was also confirmed that polymer B was accumulated in the liver inclusions from the Z- $\alpha_1$ -antitrypsin patient by using a monoclonal antibody that is also sensitive to distinguish the mechanisms. Now, one of the most interesting approaches is to design and screen drugs for  $\alpha_1$ -antitrypsin deficiency on the basis of polymer structures. In addition, I feel very curious how cell can watch the generation of these toxic proteins and its failure leads to actual diseases. This interest will probe the structural basis of protein-protein recognitions and the importance of serpin structure in our life. (by M. Yamasaki)

### 3. Study on the basal transcription factors and the application of RNA aptamers

GAGA factor (GAF) binds to GAGA element in the promoter and recruits chromatin remodeling factors in *Drosophila*. We showed that GAF was involved in the transcription complex, and bound to basal transcription factors. This result suggests a new function of chromatin remodeling factor associated protein. We used RNA aptamers as analytical tools. We succeeded to establish the multi-recognition molecule that recognizes the different molecule. RNA aptamer is expected as a substituent of antibody therapy. To expand the application of RNA aptamer as a cure drug or examination reagent, we tried to establish the construct protocol for more effective aptamers. (by K. Hirayoshi)

### 4. Detection of aberrant TCR $\beta$ gene V(D)J recombinational products, hybrid joints, from normal murine thymus.

In V(D)J recombination, the RAG proteins bind at a pair of signal sequences adjacent to the V, D or J coding regions and cleave the DNA, resulting in two signal ends and two hairpinned coding ends. The two coding ends are joined to form a coding joint, and two signal ends are joined to form a signal joint; this joining is done by the non-homologous DNA end joining pathway. A recombinational alternative in which a signal end is recombined with a coding end can also occur in a small percentage of the V(D)J recombination events and these are called hybrid joints (Figure 3). Hybrid joints involving TCR $\beta$  gene segments could not be detected in normal thymus. In this study, we have detected hybrid joint formation during TCR $\beta$  gene D to J rearrangement in thymocytes from normal mice.

Lack of ATM (ataxia-telangiectasia mutated), which plays an important role in non-homologous DNA end joining pathway, causes lymphomas at the higher rate and generates more hybrid joints. Thus, we are going to figure out the percentage of hybrid joints during TCR $\beta$  gene D to J rearrangement in thymocytes from ATM<sup>-/-</sup> mice. (by S. Fujimoto)

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Fujimori, T., Kamiya, Y., Nagata, K., Kato, K., Hosokawa, N.: Endoplasmic reticulum lectin XTP3-B inhibits endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded  $\alpha_1$ -antitrypsin variant. FEBS J. 280, 1563-1575 (2013)
- Hirano, S., Kakinuma, S., Amasaki, Y., Nishimura, M., Imaoka, T., Fujimoto, S., Hino, O., Shimada, T.: Ikaros is a critical target during simultaneous exposure to X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea in mouse T-cell lymphomagenesis. Int. J. Cancer (in press)

#### 2) 総説など

- Hosokawa, N.: Assay for endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in mammalian cells. GlycoPOD web site: Biosynthesis & Metabolism (Ed. T. Kawasaki) (2012)

---

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

- 細川暢子：糖タンパク質の品質管理-小胞体における糖鎖の「枝」の役割-平成 24 年度京都大学再生医科学研究所 学術講演会(2011.12.19. 京都市)(ポスター発表)
- Fujimori, T.: The roles of ER lectins in the protein quality control. The Joint Symposium of the 7<sup>th</sup> International Symposium of the Institute Network and the 45<sup>th</sup> IDAC Symposium, the 2<sup>nd</sup> Symposium for Joint Usage/Research Center of Aging.(2012.6.14-15. 仙台市)(ポスター発表)
- 藤森 力, 神谷由紀子, 加藤晃一：糖タンパク質品質管理機構における XTP3-B の機能解析. 第 3 回生命機能研究会(2012.9.6-7. 神戸市)(口頭発表)
- 小幡晃一：小胞体ストレス応答性遺伝子 LRRC59 の機能解析.第 3 回生命機能研究会(2012.9.7. 神戸市)(口頭発表)
- 山崎正幸：若年性肝硬変, 肺気腫を引き起こすタンパク質凝集体構造の正体とは? 第二回白眉年次報告会(2012.4.12. 京都)(口頭発表)
- 山崎正幸：タンパク質の凝集とその疾患に関して新しい概念を構築する. 平成 24 年京都大学再生医科学研究所学術講演会(2012.12.19. 京都)(ポスター発表)
- 平芳一法・法邑賢一：転写複合体形成過程における TBP/GAF 間相互作用の解析 第 84 回日本遺伝学会大会(2012.9.24-26. 福岡)
- 法邑賢一・平芳一法：RNA アプタマーを用いた GAF の機能解析 第 53 回日本分子生物学会物学会年会,(2012.12.11-14. 福岡)
- 藤本真慈, 柿沼志津子, 島田義也：TCR $\beta$  鎖遺伝子の asynchronous rearrangement は常に成立しているか? Kyoto T Cell Conference 第 22 回学術集会(2012.7.6-7. 京都)
- FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko: Detecting an aberrant V(D)J recombination, a hybrid joint, in murine thymic lymphomas. 第 41 回日本免疫学会学術集会(2012.12.5-7. 神戸)
- FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko, SHIMADA Yoshiya: Effects of X-ray irradiation on murine TCR $\beta$  chain



gene rearrangement. 第 35 回日本分子生物学会年会(2012.12.11-14. 福岡)

## 2) 招待講演・シンポジウム

Hosokawa, N.: Homeostasis and quality control of proteins in cells. The Joint Symposium of the 7<sup>th</sup> International Symposium of the Institute Network and the 45<sup>th</sup> IDAC Symposium, the 2<sup>nd</sup> Symposium for Joint Usage/Research Center of Aging. “Research Frontiers for Smart Aging”(2012.6.15. 仙台市)

山崎正幸：若年性肝硬変，肺気腫を引き起こすタンパク質凝集体構造とは？ 第 59 回 日本生化学会近畿支部例会 (2012.5.19. 京都)(シンポジウム)

山崎正幸：タンパク質の凝集とその疾患にルールはあるか？ 日本学術振興会 回折構造生物 第 169 委員会 第 39 回 研究会(2012.6.18. 東京)

山崎正幸：タンパク質の生産，その異常化から疾患までを考える．第 3 回生命機能研究会(2012.9.6. 神戸)

## 生体機能調節学分野 Department of Experimental Pathology

客員教授 坂口 志文

Visiting Prof. Shimon Sakaguchi

### 【研究概要】

#### (1) 免疫寛容の基礎的研究

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては反応しない。また、アレルギーに見られる過剰な免疫応答を阻止する機構を有している。このような免疫自己寛容、免疫恒常性維持の基礎的メカニズムとして、制御性 T 細胞による抑制的制御が重要である。その機能異常は自己免疫病、アレルギーの原因となる。制御性 T 細胞は転写因子 Foxp3 を特異的に発現するが、機能、表現型の安定性を保つためには epigenetic な変化が必要である。昨年度に引き続き、本年度も、制御性 T 細胞の発生・分化における epigenetic 変化を解析した。その結果、制御性 T 細胞に特徴的に発現し機能に必須の遺伝子(例えば、Foxp3, CTLA-4, GITR, Eos, Helios, CD25)の CpG 脱メチル化が安定な制御性 T 細胞の発生、機能維持に重要であること、ヒストンの修飾は、DNA メチル化に比して特異性が低いこと、制御性 T 細胞の細胞系譜の決定には、上述の制御性 T 細胞特異的遺伝子の脱メチル化が、Foxp3 遺伝子の発現と独立して必要であることを見出した。これらの知見は、機能的に安定な制御性 T 細胞の作製によるヒト免疫応答の制御に重要であり、現在、ヒト制御性 T 細胞について同様の解析を始めている。

#### (2) 自己免疫、腫瘍免疫、移植免疫の基礎的研究

ヒト疾患における制御性 T 細胞の役割について研究を継続した。本邦に多い成人 T 細胞白血病/リンパ腫(adult T cell leukemia/lymphoma)の多くは Foxp3 を発現し、制御性 T 細胞が腫瘍化したものである。昨年度、ATLL 細胞に発現する腫瘍抗原を検索するべく、患者血清を用いて、Seromics による網羅的蛋白アレイを行ったところ、多くの患者血清中に、がん-精巣抗原(Cancer-testis(CT)antigen)に対する抗体が出現していることを見出した。NY-ESO-1 などの CT 抗原は、ほかのヒト癌組織にも発現しているが 80% 以上の ATLL 細胞にも発現していた。CT 抗原は、他の白血病細胞には発現しておらず、極めて ATLL に特徴的である。また、患者リンパ球には、CT 抗原に反応し、サイトカインを産生する T 細胞も検出できた。これらの結果は、ATLL に対して、CT 抗原ワクチンによる免疫療法が有効である可能性を意味する。本年度、NY-ESO-1 蛋白による癌治療ワクチンの臨床試験を行うべく、そのための準備を進めた。

#### (3) 新しい動物モデルを用いた関節リウマチの原因・発症機構の研究

SKG マウスは、免疫病理学的にヒトの関節リウマチと酷似する慢性関節炎を自然発症する。その原因遺伝子は、T 細胞抗原レセプター(T cell receptor, TCR)直下に位置するシグナル分子である ZAP-70 であり、その SH2 ドメインの一塩基変異によって関節炎が誘導される。本年度、この遺伝子変異の自己免疫病発症における意味を普遍化すべく、ZAP-70 分子の様々な部位にアミノ酸変異をもち、その SH2 ドメインと TCR 鎖 ITAM 部位との結合度の異なるノックインマウスを作製した。その結果、結合度が特定の範囲まで減少すると、そのようなマウスは自己免

疫性関節炎のみならず炎症性腸炎を自然発症した。この新しい自己免疫および免疫病理学的疾患モデルの免疫学的な解析を進めている。

This department studies: (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance and the etiology of autoimmune disease; (ii) the strategy for eliciting effective immune responses to autologous tumor cells, or inducing immunologic tolerance to organ transplants, by manipulating the mechanism of immunologic self-tolerance; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of rheumatoid arthritis by utilizing an animal model established in our laboratory.

One aspect of immunologic self-tolerance (i.e., immunological unresponsiveness of the normal immune system to normal self-constituents) is actively maintained through a T cell-mediated dominant control of self-reactive T cells by naturally occurring regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (Tregs). We previously showed that the transcription factor Foxp3 is a master regulator of their development and function.

In the previous year, we showed that Treg development was achieved by the combination of two independent processes, i.e., the expression of Foxp3 and the establishment of Treg-type CpG hypomethylation, both induced by TCR stimulation. The demethylation began in the thymus and continued to proceed in the periphery, and could be fully established without Foxp3 protein. Further study this year has revealed that either Foxp3 expression or Treg-type hypomethylation alone is insufficient for establishing full Treg phenotype and function. Thus, those T cells in which the two events have concurrently occurred as a result of TCR stimulation are developmentally set into the Treg lineage. These findings can be exploited for constructing functionally stable Treg cells for clinical use.

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) is an intractable hematologic malignancy caused by human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), which infects approximately 20 million people worldwide. Last year, we found that a high percentage (more than 80%) of ATLL cells expressed Cancer/testis (CT) antigens. This contrasts with other types of lymphoma or leukemia, which scarcely express these CT antigens. Humoral immune responses, particularly against NY-ESO-1, were detected in 10% of ATLL patients and NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses were observed in more than half of ATLL patients. NY-ESO-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells recognized autologous ATLL cells and produced effector cytokines. These results indicate that vaccination with CT antigens can be an effective immunotherapy of ATLL. Now we plan to start clinical trials of therapeutic vaccination of ATL patients with CT antigen vaccine.

SKG mice with a ZAP-70 gene mutation spontaneously develop T cell-mediated autoimmune arthritis immunopathologically similar to rheumatoid arthritis (RA) in humans. This year, we have attempted to construct a new animal model of autoimmune disease by introducing a variety of mutations in the ZAP-70 gene in mice. One of such ZAP-70 gene knock-in mice spontaneously developed not only arthritis but also colitis, which are immunopathologically similar to RA and inflammatory bowel disease in humans. Depletion of Tregs enhanced these diseases and additionally produced other autoimmune diseases as well. We are currently conducting further immunological analysis of the model.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, Osaki M, Tanaka Y, Yamashita R, Nakano N, Huehn J, Fehling HJ, Sparwasser T, Nakai K, Sakaguchi S. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity*. 37 : 785-99, 2012.
- Ohkura N, Sakaguchi S. Treg cells acquire new directions, cytokines navigate. *Immunity*. 37 : 443-4, 2012.
- Hansen W, Hutzler M, Abel S, Alter C, Stockmann C, Kliche S, Albert J, Sparwasser T, Sakaguchi S, Westendorf AM, Schadendorf D, Buer J, Helfrich I. Neuropilin 1 deficiency on CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J Exp Med*. 209 : 2001-16, 2012.
- Noguchi, T., Kato, T., Wang, L., Maeda, Y., Ikeda, H., Sato, E., Knuth, A., Gnjjatic, S., Ritter, G., Sakaguchi, S., Old, L. J., Shiku, H., and Nishikawa, H. Intracellular tumor-associated antigens represent effective targets for passive immunotherapy. *Cancer Res*. 72 : 1672-1682, 2012.
- Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, Sakaguchi S, Takeda K. Dietary folic acid promotes survival of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the colon. *J Immunol*. 189 : 2869-78, 2012.
- Hamaguchi M, Sakaguchi S. Regulatory T cells expressing PPAR- $\gamma$  control inflammation in obesity. *Cell Metab*. 16 : 4-6, 2012.
- Wing JB, Sakaguchi S. Multiple treg suppressive modules and their adaptability. *Front Immunol*. 3 : 178. Epub 2012.
- Shaw LA, Stefanski AL, Peterson LK, Rumer KK, Vondracek A, Phang TL, Sakaguchi S, Winn VD, Dragone LL. Pregnancy amelioration of arthritis in SKG mice corresponds with alterations in serum amyloid A3 levels. *Am J Clin Exp Immunol*. 1 : 12-19, 2012.
- Keller KK, Lindgaard LM, Wogensén L, Dagnæs-Hansen F, Thomsen JS, Sakaguchi S, Stengaard-Pedersen K, Hauge EM. SKG arthritis as a model for evaluating therapies in rheumatoid arthritis with special focus on bone changes. *Rheumatol Int*. 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]
- Nishikawa, H., Maeda, Y., Ishida, T., Gnjjatic, S., Sato, E., Mori, F., Sugiyama, D., Ito, A., Fukumori, Y., Utsunomiya, A., Inagaki, H., Old, L. J., Ueda, R., and Sakaguchi, S. Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. 119 : 3097-3104, 2012.
- Sakaguchi, S., Benham, H., Cope, A. P., Thomas, R. T-cell receptor signaling and the pathogenesis of autoimmune arthritis : insights from mouse and man. *Immunol Cell Biol*. 90 : 277-87, 2012.
- Meziani R, Yamada R, Takahashi M, Ohigashi K, Morinobu A, Terao C, Hiratani H, Ohmura K, Yamaguchi M, Nomura T, Vasilescu A, Kokubo M, Renault V, Hirose K, Ratanajaraya C, Heath S, Mimori T, Sakaguchi S, Lathrop M, Melchers I, Kumagai S, Matsuda F. A trans-ethnic genetic study of rheumatoid arthritis identified FCGR2A as a candidate common risk factor in Japanese and European populations. *Mod Rheumatol*. 22 : 52-8, 2012.
- Sakaguchi, S., Powrie, F., Ransohoff, R. M. Re-establishing immunological self-tolerance in autoimmune disease. *Nat Med*. 18 : 54-58, 2012.



- Keith, R. C., Powers, J. L., Redente, E. F., Sergew, A., Martin, R. J., Gizinski, A., Holers, V. M., Sakaguchi, S., Riches, D. W. A Novel Model of Rheumatoid Arthritis-Associated Interstitial Lung Disease in SKG Mice. *Exp Lung Res.* 38 : 55-66, 2012.
- Ohe, H., Waki, K., Yoshitomi, M., Morimoto, T., Nafady-Hego, H., Satoda, N., Li, Y., Zhao, X., Sakaguchi, S., Uemoto, S., Bishop, G. A., Koshiba, T. Factors affecting operational tolerance after pediatric living-donor liver transplantation : impact of early post-transplant events and HLA match. *Transpl Int.* 25 : 97-106, 2012.
- Yoshioka, Y., Ono, M., Osaki, M., Konishi, I., Sakaguchi, S. Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol.* 42 : 749-759, 2012.

## 2) 総 説

- 木本富子, 坂口志文 : 制御性 T 細胞と移植免疫 実験医学 Vol.30 No.10(1677-1682)2012
- 大倉永也, 坂口志文 : Foxp3 遺伝子発現のエピジェネティクス制御 臨床免疫・アレルギー科 Vol.57 No.4(351-359) 2012

## ◆ 学会等の講演 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- Nicholas Edward Crabb, Motomu Hashimoto, Yoshinaga Ito, Tosei Murase, Atushi Tanaka, and Shimon Sakaguchi : The contribution and cellular source of GM-CSF in a murine model of autoimmunity. Kyoto T Cell Conference 第 22 回学術集会 (2012.7.6-7. 京都)
- 濱口真英, 坂井 薫, 大倉永也, 島津 裕, 森川洋匡, 坂口志文 : Transcriptional complexes containing Foxp3 and Bcl11b control Treg suppressive function. Kyoto T Cell Conference 第 22 回学術集会 (2012.7.6-7. 京都)
- TANAKA Atsusi, NOMURA Takashi, AKIZUKI Shuuji, Daron Standley SAKAGUCHI Noriko, SAKAGUCHI Shimon : Spontaneous development of autoimmune arthritis and colitis in ZAC mice. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012.12.5-7. 神戸)
- James Wing Sakaguchi Shimon : T-regulatory cell control of B-cell functions.. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012.12.5-7. 神戸)
- HAMAGUCHI Masahide, SAKAI Kaoru, OHKURA Naganari, MORIKAWA Hiromasa, SHIMAZU Yutaka, SAKAGUCHI Shimon : Transcriptional complexes containing Foxp3 and Bcl11b control Treg suppressive function. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012.12.5-7. 神戸)
- MORIKAWA Hiromasa, OHKURA Naganari, Alexis Vandenbon, Darron M. Standley, SAKAGUCHI Shimon : The effect of regulatory T cell-specific epigenetic conversion on its transcriptional regulation. 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012.12.5-7. 神戸)
- OHKURA Naganari, HAMAGUCHI Masahide, MORIKAWA Hiromasa, SUGIMURA Kyoko, TANAKA Atsushi, ITO Yoshinaga, OSAKI Motonao, NAKANO Naoko, SAKAGUCHI Shimon : Epigenetic conversion and Foxp3 expression are complimentary events required for regulatory T cell development 第 41 回日本免疫学会学術集会 (2012.12.5-7. 神戸)
- MAEDA Yuka, NISHIKAWA Hiromasa, TANEMURA Atsushi NISHIOKA Megumi, SUGIYAMA Daisuke,

KATAYAMA Ichiro, SAKAGUCHI Shimon : Immunosuppression by regulatory T cells in malignant melanoma. 第 41 回日本免疫学会学術集会(2012.12.5-7. 神戸)

OSAKI Motonao, SAKAGUCHI Shimon : Analysis of CTLA-4 splice variants in regulatory T cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会(2012.12.5-7. 神戸)

KITOH Akihiko, KUSABA Nobuhiro, MIYACHI Yosiki, SAKAGUCHI Shimon, YANAGI Yusuke, KABASHIMA Kenji : SLAM-dependent and independent mechanism of IgE induction 第 41 回日本免疫学会学術集会(2012.12.5-7. 神戸)

## 2) 講演・シンポジウム

Shimon Sakaguchi : Regulatory T Cells for immune regulation. International symposium : Infection, immunity and cancer (2012.1.16-17. 京都)

Shimon Sakaguchi : Autoimmunity. Winter School 2012 on Advanced Immunology(2012.1.16-17. 淡路島)

Shimon Sakaguchi : Molecular basis of regulatory T cells development and their functional stability. Max Planck Institute of Neurobiology (2012.3.22. Munich Germany)

Shimon Sakaguchi : Treg development and function. International Symposium Migration and Regulation : Managing immune-mediated diseases (2012.3.26. Berlin Germany)

Shimon Sakaguchi : Molecular basis of regulatory T cells development and their functional stability. Helmholtz Centre for Infection Research (2012.3.28. Braunschweig Germany)

Shimon Sakaguchi : Molecular basis of regulatory T cells development and their functional stability. Centre for Immune Regulation University of Oslo (2012.3.30. Oslo Norway)

坂口志文 : 制御性 T 細胞と腫瘍免疫 第 1 回癌・免疫若手セミナー(2012.4.12. 大阪)

Shimon Sakaguchi : Genetic basis of the development and function of natural Foxp3-expressing regulatory T cells. novo nordisk innovation summit Tokyo 2012 chronic inflammation and autoimmune diseases(2012.4.17-18. 東京)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 18 回千葉基礎・臨床免疫セミナー(2012.5.11. 千葉)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 10 回北東北血液研究会(2012.5.12. 秋田)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 2 回北摂呼吸器・アレルギー研究会(2012.5.18. 大阪)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 66 回日本栄養・食糧学会(2012.5.18-20. 仙台)

Shimon Sakaguchi : Roles of concurrent epigenetic conversion and Foxp3 expression for the development and function of regulatory T cells International Symposium Dynamism of Immune Reactions & Regulation (2012.5.22-23. 大阪)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 The 4th BMC(Brainstorming Medical Conference)(2012.5.26-27. 東京)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 14 回白馬シンポジウム in 京都(2012.6.7-8. 京都)

Shimon Sakaguchi : Genetic and Epigenetic Basis of Regulatory T Cell Function in Their Clinical Application. FO-CiS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2012 (2012.6.20-23. Vancouver, Canada)

坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 12 回先端医療センター Monthly Lecture(2012.7.5. 神戸)

坂口志文 : 制御性 T 細胞と免疫寛容, 免疫制御 第 14 回日本免疫学会免疫サマースクール 2012(2012.7.23-26. 那

須)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 14 回日本免疫学会免疫サマースクール 2012(2012.7.23-26. 那須)

坂口志文：制御性 T 細胞と自己免疫病 第 2 回 T-cell Camp(2012.8.4-5. 小田原)

Shimon Sakaguchi：Genetic and Epigenetic Control of Regulatory T cell Function 3rd European Congress of Immunology (2012.9.5-8. Glasgow, UK)

Shimon Sakaguchi：Genetic and Epigenetic Control of Regulatory T cell Function. National Institute for Medical Research (2012.9.10. Mill Hill, UK)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 13 回運動器科学研究会(2012.9.14-15. 京都)

Shimon Sakaguchi：Genetic and Epigenetic Control of Regulatory T cell Development and Function. French-Japanese Meeting(2012.9.20-21. 東京)

Shimon Sakaguchi：Genetic and Epigenetic Control of Regulatory T cell Development. The 12th International Symposium on Dendritic Cells (2012.10.7-11. Daegu Korea)

Shimon Sakaguchi：Genetic and Epigenetic Control of Regulatory T cell Development. The Third International Conference on Regulatory T Cells and Helper T Cell Subsets and Clinical Application in Human Diseases (2012.10.13-16. Shanghai China)

Shimon Sakaguchi：Genetic and Epigenetic Control of Regulatory T cell Development. The 34th Naito Conference on Infection, Immunity and their Control for Health：Mucosal Barrier, Pathogen and Vaccine(2012.10.16-19. 札幌)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 2012 Young Physician Workshop(2012.10.24. 京都)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 大阪医科大学大学院特別講義(2012.11.8. 大阪)

Shimon Sakaguchi：Regulatory T cells in autoimmune diseases 橋本病百周年記念国際シンポジウム International Symposium I(2012.12.1. 福岡)

Shimon Sakaguchi：T cell signaling, Regulatory T cells, and Autoimmune Diseases. 橋本病百周年記念国際シンポジウム International Symposium II(2012.12.2-4. 福岡)

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 41 回日本免疫学会学術集会(2012.12.5-7. 神戸)

大倉永也：Epigenetic conversion defines the regulatory T cell lineage. 第 41 回日本免疫学会学術集会(2012.12.5-7. 神戸)

坂口志文：制御性 T 細胞を標的とした免疫応答制御の展望 第 41 回日本免疫学会学術集会(2012.12.5-7. 神戸)

(賞)

朝日賞

日本学士院賞

米国科学アカデミー(National Academy of Sciences USA)外国人会員に選出

## 生体システム制御学分野 Department of Immunobiology and Hematology

分野主任 教授 長澤 丘司

Prof. Takashi Nagasawa

### 【研究概要】

リンパ球を含むすべての血液細胞やその前駆細胞は、骨の中心部の骨皮質に囲まれた空間である骨髓で造血幹細胞から一生涯にわたり恒常的に産生される。造血幹細胞や前駆細胞は、骨髓の中に想定されているニッチ(niche)と呼ばれる特別な微小環境で維持され、その増殖・分化が調節されていると推測されてきたがこの造血ニッチの実体は長年不明であった。2003年、米国のLiらは、骨辺縁の骨芽細胞の一種でありNカドヘリンを高発現するSNO細胞が造血幹細胞ニッチを形成することを報告し注目された(Zhang, J. et al., *Nature* 425, 836-841 (2003))。一方、米国のMorrisonらは、造血幹細胞の多くは骨髓腔内で網の目のように分布する洞様毛細血管の周囲に存在することを報告した(Kiel, M.J. et al., *Cell* 121, 1109-1121 (2005))。しかし、Liらの報告の根拠となった造血幹細胞の組織学的観察法は十分とは言えず(Kiel, M.J. et al., *Nature* 449, 238-242 (2007))、いずれの報告においてもそれぞれのニッチ細胞の機能が証明されるには至っていなかった。

私たちは、これまでに、ケモカインCXCL12とその生理的受容体CXCR4が、胎生期における造血幹細胞の骨髓へのホーミング(細胞が臓器に移動、定着すること)、成体骨髓での造血幹細胞と形質細胞(最終分化し抗体産生に特化したB細胞)の維持やB細胞(抗体を産生する主要な免疫担当細胞)と形質細胞様樹状細胞(pDC)(I型インターフェロンを多量に産生する抗ウイルス免疫に重要な免疫担当細胞)の産生に必須であることを明らかにした(Nagasawa, T. et al. *Nature* 382, 635-638 (1996); Tachibana, K. et al. *Nature* 393, 591-594 (1998); Egawa, T. et al. *Immunity* 15, 323-334 (2001); Ara, T. et al. *Immunity* 19, 257-267 (2003); Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006); Kohara, H. et al. *Blood* 110, 4153-4160 (2007))。さらに、CXCL12の生理的な発現細胞を可視化することができるCXCL12遺伝子座にGFP遺伝子を挿入したマウス(CXCL12-GFPノックインマウス)を用いて、成体骨髓において骨髓腔内にびまん性に分布しCXCL12を高発現する細網細胞(以下CXCL12-abundant reticular(CAR)細胞)が存在することを見出した。また、洞様毛細血管の大部分はCAR細胞に取り囲まれており、造血幹細胞を濃縮する分画内の細胞、早期のB細胞の前駆細胞や形質細胞、pDCの大部分がCAR細胞の長い細胞突起に接着しておりCAR細胞が造血幹細胞・前駆細胞のニッチである可能性を示唆した(Tokoyoda, K. et al. *Immunity* 20, 707-718 (2004); Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006); Kohara, H. et al. *Blood* 110, 4153-4160 (2007))。

＊

最近、私たちは、CAR細胞の実体を明らかにし、CAR細胞の生体でのニッチとしての機能を証明するため、ヒト特異的なジフテリア毒素(DT)受容体遺伝子を用いてDTによりCAR細胞の特異的細胞死を誘導することができるマウス(以後CAR細胞欠損マウス)を作製し解析した(Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010))。その結果、CAR細胞は、造血幹細胞の増殖と未分化性の維持に必須であること、B細胞前駆細胞、赤血球前駆細胞の増殖にも必須であること、造血に必須のサイトカインであるCXCL12、SCFの骨髓での主たる産生細胞であることを明らかにした。また、CAR細胞欠損マウスの骨髓細胞は、試験管内培養系で産生される骨芽細胞、脂肪細胞の細胞数が著明に減少しており、個々のCAR細胞の大部分が骨芽細胞、脂肪細胞の発生に必須の転写因子の遺伝



子を両方発現し、試験管内培養で骨芽細胞または脂肪細胞に分化したことから、CAR 細胞は骨芽細胞・脂肪細胞共通前駆細胞であることが示された (Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010)).

\*

私たちの CAR 細胞に関する研究によって、造血を支持する骨髄のニッシェ細胞についての理解が大きく進んだ (Nagasawa, T. et al. *Trends Immunol.* 32; 315-320 (2011)). 昨年、米国の Morrison らによる SCF を発現する細胞を蛍光蛋白質 GFP で可視化できる SCF-GFP ノックインマウス (SCF 遺伝子座に GFP 遺伝子を挿入) の解析で、骨髄には SCF を高発現する細胞が存在して CD150<sup>+</sup>CD41<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>造血幹細胞分画の約 67% と接着すること、SCF 高発現細胞はレプチン受容体 (leptin receptor; lepr) を特異的に高発現することが報告された。更に、レプチン受容体 Cre トランスジェニックマウスと Cre によって SCF 遺伝子が欠損する SCF<sup>flox/flox</sup> マウスの解析より SCF 高発現細胞で SCF を欠損させると造血幹細胞数が約 5 分の 1 に減少したことから SCF 高発現細胞が造血幹細胞ニッシェであることが報告された (Ding, L. et al. *Nature* 481; 457-462 (2012)). 先に述べたように CAR 細胞は、SCF の主たる産生細胞であることから SCF 高発現細胞は CAR 細胞とほぼ同一であると考えられる。実際、私たちは、lepr は骨髄において CAR 細胞で特異的に発現することを確認した。以上より、CAR 細胞は、CXCL12 と SCF を産生する造血幹細胞の増殖と未分化性の維持に必須のニッシェ細胞であると考えられる (細網細胞ニッシェ)。現在、正常と疾患における造血制御の全貌を明らかにすることを目標に、CAR 細胞の発生の分子機構、CAR 細胞の造血幹細胞やリンパ球前駆細胞を維持する機構、CAR 細胞の標的細胞の特異性を決定する機構、炎症や感染症での造血調節における CAR 細胞の機能とこれを制御する分子機構、CAR 細胞の白血病幹細胞ニッシェとしての機能を解明するための研究に取り組んでいる。

Chemokines are a large family of small structurally related chemoattractive cytokines that utilize seven-transmembrane spanning G-protein-coupled receptors (GPCR). We identified CXC chemokine ligand 12 (CXCL12), also known as stromal cell-derived factor (SDF)-1 as pre-B-cell growth stimulating factor and found that CXCL12 and its primary receptor CXCR4 were essential for hematopoiesis, including colonization of bone marrow by hematopoietic stem cells (HSCs) during ontogeny, maintaining a pool of HSCs in adult bone marrow and development of all immune cells produced in bone marrow, including B cells, plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and NK cells as well as cardiogenesis and organ vascularization during ontogeny (Nagasawa, T. et al. *Nature* 382, 635-638 (1996); Tachibana, K. et al. *Nature* 393, 591-594 (1998); Egawa, T. et al. *Immunity* 15, 323-334 (2001); Ara, T. et al. *Immunity* 19, 257-267 (2003); Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006); Kohara, H. et al. *Blood* 110, 4153-4160 (2007); Noda, M. et al. *Blood* 117, 451-458 (2011)).

On the other hand, we have identified a small population of non-hematopoietic cells expressing high amounts of CXCL12, termed CXCL12-abundant reticular (CAR) cells with long processes. We have revealed that CAR cells were scattered throughout bone marrow and that most HSCs, early B cell precursors, the end-stage B lymphocytes, plasma cells, pDCs and NK cells were attached to the processes of CAR cells, suggesting that CAR cells function as the special microenvironments, termed 'niches' for HSCs and immune cells (Tokoyoda, K. et al. *Immunity* 20, 707-718 (2004), Sugiyama, T. et al. *Immunity* 25, 977-988 (2006)). In 2010, we generated mice that allow selective ablation of CAR cells within bone marrow and determined the nature and in vivo function of CAR cells as a niche for HSCs and lympho-hematopoietic progenitors (Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010)). Short-term ablation of CAR cells in vivo did not affect candidate niches, bone-lining osteoblasts or endothelial cells but severely impaired the

adipogenic and osteogenic differentiation potential of marrow cells and production of SCF and CXCL12, and led to a marked reduction in cycling lymphoid and erythroid progenitors. HSCs from CAR cell-depleted mice were reduced in number and cell size, were more quiescent and had increased expression of early myeloid selector genes, similar to the phenotype of wild-type HSCs cultured without a niche. Thus, the niche composed of adipo-osteogenic progenitors is required for production of CXCL12 and SCF, proliferation of HSCs and lymphoid and erythroid progenitors as well as maintenance of HSCs in an undifferentiated state (Omatsu, Y. et al. *Immunity* 33, 387-399 (2010); Nagasawa, T. et al. *Trends Immunol.* 32; 315-320 (2011)). Recently, Ding et al., reported that cells which expressed high levels of SCF preferentially expressed the receptor for leptin (*lepr*) and that the numbers of HSCs were reduced by about 5-fold when SCF was conditionally deleted from leptin-expressing cells (Ding, L., et al. *Nature* 481; 457-462 (2012)). We have confirmed that *lepr* is preferentially expressed in CAR cells. Thus, the results shown by Ding et al., support the idea that CAR cells function as a niche for HSCs.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Sasaki, I., Hoshino, K., Sugiyama, T., Yamazaki, C., Yano, T., Iizuka, A., Hemmi, H., Tanaka, T., Saito, M., Sugiyama, M., Fukuda, Y., Ohta, T., Sato, K., Aina, A., Suzuki, T., Hasegawa, H., Toyama-Sorimachi, N., Kohara, H., Nagasawa, T., Kaisho, T., Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood* 120; 4733-4743, 2012.
- Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Takashima, S., Takehashi, M., Ogonuki, N., Morimoto, H., Nagasawa, T., Ogura, A., Shinohara, T., Reconstitution of mouse spermatogonial stem cell niches in culture. *Cell Stem Cell* 11; 567-578, 2012.
- Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D.F., Young, H.M., Enomoto, H., Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat. Neurosci.* 15(9); 1211-1218, 2012.
- Tsuchiya, A., Imai, M., Kamimura, H., Takamura, M., Yamagiwa, S., Sugiyama, T., Nomoto, M., Heike, T., Nagasawa, T., Nakahata, T., Aoyagi, Y., Increased Susceptibility to Severe Chronic Liver Damage in CXCR4 Conditional Knock-Out Mice. *Dig. Dis. Sci.* 57(11); 2892-2900, 2012.
- Sudo, T., Yokota, T., Oritani, K., Satoh, Y., Sugiyama, T., Ishida, T., Shibayama, H., Ezoe, S., Fujita, N., Tanaka, H., Maeda, T., Nagasawa, T., Kanakura, Y., The Endothelial Antigen ESAM Monitors Hematopoietic Stem Cell Status between Quiescence and Self-Renewal. *J. Immunol.* 189(1); 200-210, 2012.
- Umemoto, E., Otani, K., Ikeno, T., Verjan Garcia, N., Hayasaka, H., Bai, Z., Jang, M.H., Tanaka, T., Nagasawa, T., Ueda, K., Miyasaka, M., Constitutive Plasmacytoid Dendritic Cell Migration to the Splenic White Pulp Is Cooperatively Regulated by CCR7- and CXCR4-Mediated Signaling. *J. Immunol.* 189(1); 191-199, 2012.
- Murata, K., Kitaori, T., Oishi, S., Watanabe, N., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Kasahara, T., Shibuya, H., Fujii, N., Nagasawa, T., Nakamura, T., Ito, H., Stromal cell-derived factor 1 regulates the actin organization of chondrocytes and chondrocyte hypertrophy. *PLoS One*. 7(5); e37163, 2012

Nakamura-Ishizu, A., Okuno, Y., Omatsu, Y., Okabe, K., Morimoto, J., Uede, T., Nagasawa, T., Suda, T., Kubota, Y.,  
Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* 119(23); 5429-5437, 2012.

## 2) 英文総説

Sugiyama, T., Nagasawa, T., Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells.  
*Inflamm. Allergy Drug Targets* 11; 201-206, 2012.

## 3) 和文総説, 図書

長澤丘司, 尾松芳樹, 杉山立樹 “造血幹細胞のニッチと造血調節” Annual Review 2012 血液 高久史磨、小澤敬也、坂田洋一、金倉 譲、小島勢二編 中外医学社 1-8(2012)

長澤丘司, “ケモカインと免疫応答・免疫病態” 免疫学 Update－分子病態の解明と治療への展開 審良静男, 熊ノ郷淳, 竹田 潔編 南山堂 136-145(2012)

長澤丘司, “骨髄ニッチと造血” 医学のあゆみ～ Vol. 242, 705-711(2012)

長澤丘司, “骨組織と造血幹細胞ニッチ” Clinical Calcium Vol. 22 No 11(医薬ジャーナル社), 29-37(2012)

長澤丘司, 尾松芳樹, 杉山立樹, “ニッチによる組織幹細胞の維持” 実験医学 Vol. 30 No 10(増刊), 21-28(2012)

長澤丘司, “造血制御サイトカインの基礎研究の進歩”, 日本臨床「造血管腫瘍学」(増刊) 70 巻 151-158(2012)

長澤丘司, “CXCL12” 臨床免疫・アレルギー科「サイトカインのすべて」(増刊) Vol. 57, 317-322(2012)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 招待講演

長澤丘司, 第2回 DDS 除放化再生医療研究会 ランチョンセミナー “造血幹細胞と血液細胞の産生を調節する司令塔～骨髄の微小環境ニッチ～” (2012.12.22. 京都)

T. Nagasawa, 第41回日本免疫学会学術集会 シンポジウム Lymphocyte development “The adipo-osteogenic progenitors with long processes function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells” (2012.12.5. 神戸)

長澤丘司, 第41回日本免疫学会学術集会 レビュートーク “免疫担当細胞の産生と造血幹細胞・前駆細胞ニッチ” (2012.12.5. 神戸)

T. Nagasawa, The 9th Nikko International Symposium 2012, Understanding complex network systems in disease biology. “Adipo-osteogenic progenitors function as niches for hematopoietic stem and progenitor cells in the marrow” (2012.10.12. Tochigi)

長澤丘司, 第11回 リウマチ膠原病・よつやセミナー(特別講演) “免疫担当細胞の産生を制御する骨髄の造血幹細胞ニッチ” (2012.9.8. 東京)

長澤丘司, 第30回 日本骨代謝学会学術集会 カレントコンセプト1 骨髄とがん細胞 “骨髄の脂肪・骨前駆細胞 CAR 細胞と造血幹細胞ニッチ” (2012.7.19. 東京)

長澤丘司, 第33回 日本炎症・再生医学会 シンポジウム 炎症と骨・骨髄 “骨髄の造血幹細胞・造血ニッチ” (2012.7.5. 福岡)

長澤丘司, 第 12 回 日本加齢医学会総会 シンポジウム 24 “骨髄の微小環境(ニッチ)による造血幹細胞と造血の制御”(2012.6.24. 横浜)

長澤丘司, 第 32 回 大阪血液学セミナー “骨髄造血の司令塔, 幹細胞ニッチの実体と機能を考える”(2012.5.18. 大阪)

長澤丘司, 第 101 回 日本病理学会総会 ワークショップ 造血幹細胞の病理:最先端研究から診断まで, “骨髄の脂肪・骨前駆細胞 CAR 細胞と造血幹細胞ニッチ”(2012.4.26. 東京)

長澤丘司, 大阪府立母子保健総合医療センター設立 30 周年記念事業, 研究所設立 20 周年記念, 平成 23 年度 母と子のすこやか基金シンポジウム「母子医療センターと医学研究」“骨髄造血の司令塔, 幹細胞ニッチの実体と機能を考える”(2012.3.6. 大阪)

Takashi Nagasawa, The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 9th Global COE international Symposium; Cell Migration in Biology and Medicine, “Bone marrow niches controlling behavior of hematopoietic stem and progenitor cells” (2012.1.22-23. Fukuoka)



# 生体組織工学研究部門

## 生体分子設計学分野 Department of Cellular Differentiation

分野主任 教授 開 祐司

*Prof. Yuji Hiraki*

### 【研究概要】

本研究分野では、組織血管化、軟骨・腱・靭帯形成とその再生修復の分子機構の解明を主たるテーマとして、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどの動物モデル、細胞培養系を駆使して分子レベルでの解析を行っている。現在の研究テーマは、以下の通りである。

#### 1. Chondromodulin-I に関する研究

##### (1) 血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) の血管内皮細胞に対する作用に関する研究

我々は、ウシ胎仔骨端軟骨から血管新生抑制因子 ChM-I を精製・クローニングした。ChM-I は主に軟骨や心臓弁などの無血管に保たれる間葉組織に特異的に発現し、血管内皮細胞の遊走・増殖・管腔形成阻害活性を示す。さらに、ChM-I ノックアウトマウスの解析では、加齢に伴い心臓弁に異常な血管化が惹起されることから、ChM-I が組織の無血管性の維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、血管内皮細胞に対する ChM-I の作用機序については十分に解析されていない。そこで、組換えヒト ChM-I タンパク質 (rhChM-I) を調製し、ChM-I によって誘導される最も初期の血管新生抑制応答である細胞遊走の阻害作用について詳細に検討した。rhChM-I は Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) のみならず、Fibroblast Growth Factor-2 や Insulin-like Growth Factor-I など種々の遊走刺激へのヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) のケモタキシスを阻害した。rhChM-I 存在下では VEGF-A 刺激に伴う HUVECs のアクチン細胞骨格および接着斑の再構成は著明に阻害され、Rac1 およびアクチン脱重合因子 cofilin の活性制御に異常が認められた。これらの結果を支持するように、タイムラプスにより HUVECs の細胞運動を観察すると、rhChM-I 処理細胞では、VEGF-A によって誘導される持続的な葉状仮足の形成が阻害され、一過性の仮足形成が高頻度に認められて、細胞の移動速度、定方向性が顕著に低下していた。以上の結果より、ChM-I は刺激依存的なアクチン細胞骨格の再構成を阻害することにより葉状仮足の伸長を不安定化して、細胞の運動性を抑制することが明らかとなった。このような遊走阻害作用は、線維芽細胞などに対してはほとんど認められず種々の血管内皮細胞において選択的に認められたことから、ChM-I の作用は血管内皮細胞に対する特異な作用機序を介していると考えられた。

##### (2) ChM-I の活性ドメイン構造に関する研究

ChM-I は 120 アミノ酸から成る糖タンパク質で、N 型糖鎖結合部位を含む N 末端側の親水性ドメイン (ドメイン 1) と、C 末端側にある疎水性のシステインリッチドメイン (ドメイン 2) から構成されている。我々はこれまでに CHO 細胞や 293-F 細胞などの哺乳細胞発現系を用いて糖鎖修飾されているヒト組換え ChM-I タンパク質 (G-hChM-I) を発現し、軟骨細胞および血管内皮細胞に対する生物活性を明らかにしてきた。一方、大腸菌 *E. coli* を用いてヒト組換え ChM-I タンパク質を発現させると、糖鎖修飾を欠いた ChM-I (NG-hChM-I) を得ることができる。

G-hChM-I と同様に、NG-hChM-I は弱いながら軟骨細胞のコロニー形成促進作用および血管内皮細胞の管腔形成阻害作用を示した。この活性は V8 プロテアーゼによる限定分解によって糖鎖修飾部位を含むドメイン 1 の一部を欠失させた  $\Delta$ N-hChM-I においてもほとんど変わらないことから、ドメイン 2 が ChM-I の活性ドメインであることが示唆された。これらのタンパク質の CD スペクトルを測定し、二次構造を解析した結果、ドメイン 1 内の糖鎖修飾はタンパク質の溶解性だけでなく、ChM-I が活性なドメイン構造を獲得するのに必要な機能ドメインであることが明らかとなった。現在、変異体タンパク質および合成ペプチドを用いて活性ドメイン構造の解析を進めている。ChM-I は、関連遺伝子である Tenomodulin を除くと、これまでに知られている血管新生抑制因子とホモロジーを示さないことから、その活性ドメインは血管新生抑制活性を有する新たなペプチド薬として応用が期待される。

## 2. Sox9 による腱細胞から軟骨細胞への分化転換

Sox9 (SRY-related high-mobility group box-containing gene 9) は、軟骨細胞分化に必須の転写因子である。我々は、*Sox9* の強制発現によって腱細胞が軟骨細胞へと直接に分化転換することを見出した。ニワトリ胚において、*Sox9* は軟骨組織で強い発現が認められた。その一方で、腱細胞分化の早期及び後期のマーカー遺伝子である *Scleraxis* (*Scx*) 及び *Tenomodulin* (*Tnmd*) が発現する腱組織では、*Sox9* の発現は検出されなかった。レトロウイルスを用いてニワトリ胚の前肢全体に *Sox9* を強制発現させると、腱・靱帯、軟骨膜・骨膜、筋上膜、及び真皮といった線維性の結合組織において異所性の軟骨形成が誘導された。ニワトリ胚から分離した腱細胞では、basic helix-loop-helix (b-HLH) 型転写因子である *Scx*, *Paraxis*, *Twist1*, 及び *Twist2* の強制発現により *in vitro* で *Tnmd* の発現が顕著に上昇した。しかし、*Sox9* を強制発現すると、腱細胞での *Tnmd* 及び *Scx* の発現が低下し、*Type II collagen* 及び *Chondromodulin-I* などの成熟軟骨細胞マーカー分子の発現が誘導された。また、*Sox9* を強制発現した腱細胞では、細胞形態が線維芽細胞様の紡錘型から軟骨細胞様の多角型へと変化し、さらに軟骨性の細胞外基質の蓄積も検出された。以上の結果から、*in vitro* 及び *in vivo* において、腱細胞は *Sox9* により軟骨細胞へと分化転換する特性を有していることが明らかとなった。

## 3. 軟骨性骨原基の血管侵入障壁に関する研究

内軟骨性骨形成では、血管侵入を契機に、無血管の軟骨から骨・骨髄への置換が開始される。この軟骨への血管侵入は、時間的にも空間的にも極めて厳密に制御されているが、その分子機構には不明な点が多い。そこで、軟骨に発現している VEGF-A isoform をマウス及びニワトリ胚前肢に過剰発現させることによって血管新生を亢進させ、内軟骨性骨形成の進展に伴う軟骨の血管侵入抵抗性の変化を解析した。その結果、いずれの VEGF-A isoform を過剰発現させても、軟骨と軟骨膜を含む軟骨周囲組織は無血管に保たれていた。すなわち、内軟骨性骨形成の初期には、軟骨と軟骨周囲組織という 2 種類の異なった血管侵入障壁が存在することが明らかになった。しかしながら、骨髄の形成に続いて、heparin や neuropilin と相互作用する VEGF-A<sub>146</sub>, VEGF-A<sub>166</sub>, VEGF-A<sub>190</sub> を過剰発現している前肢では、早期に軟骨膜が血管化された。一旦、軟骨膜が血管化されると、骨髄では MMP9 陽性の破骨細胞が出現し、血管侵入部位では骨格系細胞で MMP9 や MMP13 の遺伝子発現を誘導する TGF- $\beta$  のシグナリングが活性化され、軟骨への血管侵入が誘導された。一方、heparin に結合しない VEGF-A<sub>122</sub> や neuropilin と相互作用する領域を欠失した VEGF-A<sub>166</sub> $\Delta$ E<sub>162</sub>-R<sub>166</sub> を過剰発現させても、早期の軟骨膜血管化や軟骨への血管侵入は観察されなかった。従って、軟骨への血管侵入に先立つ軟骨膜血管化では、無血管の軟骨周囲組織が VEGF-A の isoform 特異的な応答能を獲得し、血管侵入抵抗性を失うプロセスが存在することが明らかになった。

#### 4. ゼブラフィッシュ胚の生体蛍光イメージング技術を用いた無血管な軟骨組織形成プロセスの可視化

胚が透明で発生の早いゼブラフィッシュの軟骨および血管を蛍光タンパク質により可視化することで、発生過程において間葉組織中に無血管な軟骨組織が形成されるプロセスを解析している。マウスでは、*Col2a1* 遺伝子の軟骨組織特異的な発現は、SRY-box 9(Sox9)が結合する第1イントロン内の48bpからなるエンハンサーによって制御されている。このエンハンサーの4回繰り返し配列を *Zebrafish enhancer detection (ZED) vector* に組み込み、Tol2トランスポゾンを用いて、軟骨で Enhanced green fluorescent protein(EGFP)を発現するトランスジェニックフィッシュの系統(*col2a1 : GFP*)を確立した(図1a-d)。*col2a1 : GFP*では、生後2日目から頭部や胸ヒレに出現する軟骨細胞でEGFPの発現が認められ(図1b)、生後21日目幼魚の軟骨組織においてもEGFPの発現が検出された(図1d)。また、*flk1 (vegfr2)*遺伝子の血管内皮細胞特異的発現制御領域を用いて、血管を赤色蛍光蛋白質であるmCherryによって可視化したトランスジェニックフィッシュの系統(*flk1 : mCherry*)を確立した(図1e-h)。この*flk1 : mCherry*と*col2a1 : GFP*を交配することで、軟骨組織と血管を同時に蛍光観察可能なダブルトランスジェニックフィッシュ(*col2a1 : GFP ; flk1 : mCherry*)を作成することが可能となった。現在、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、*col2a1 : GFP ; flk1 : mCherry*の胸ヒレの軟骨形成領域と血管網の相互作用について解析を進めている。(図1i-k)。

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks underlying vascularization of mesenchymal tissues and formation of skeletal tissues such as cartilage, bone and

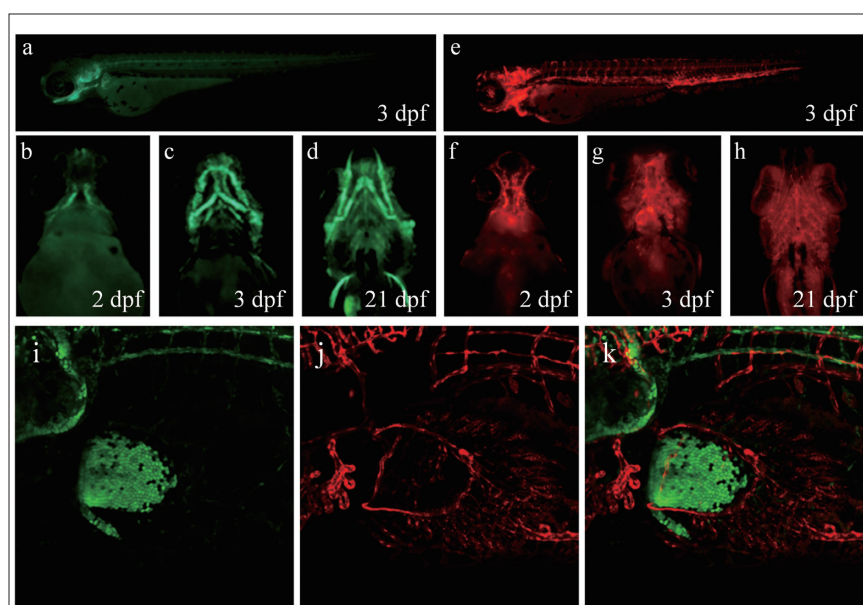


図1 蛍光イメージングにより軟骨および血管を可視化したトランスジェニックゼブラフィッシュ (a-d) *col2a1 : GFP* の生後2日目(b), 3日目(a, c), 21日目(d)におけるEGFPの発現。頭部の軟骨や胸ヒレの軟骨において強いEGFPの発現が認められる。(e-h) *flk1 : mCherry* の2日目(f), 3日目(e, g), 21日目(h)におけるmCherryの発現。(i-k)共焦点レーザー顕微鏡により観察した *col2a1 : GFP ; flk1 : mCherry* (10 dpf)の胸ヒレにおけるEGFP(i)およびmCherry(j)の発現(Z-projection)。EGFPは軟骨の、mCherryは血管の場所をそれぞれ示している。各々の画像を重ね合わせることで、軟骨と血管網の関係が可視化される(k)。

Fig. 1 Live fluorescence imaging of cartilage and the vascular network in transgenic zebrafish (a-d) GFP expression in *col2a1 : GFP* at 2 dpf (b), 3 dpf (a, c), and 21 dpf (d). GFP is detected in cartilage of the head and the pectoral fin. (e-h) mCherry expression in *flk1 : mCherry* at 2 dpf (f), 3 dpf (e, g), and 21 dpf (h). (i-k) Z-projection of GFP (i) and mCherry (j) of the pectoral fin at 10 dpf. Cartilage and blood vessels are visualized by GFP and mCherry expression, respectively. A merged image (k) shows avascular cartilage formation in zebrafish.

tendon/ligaments. Our current research efforts are focused on the following studies.

## **1. Functional analysis of Chondromodulin-I (ChM-I)**

### **(1) The inhibitory actions of ChM-I on the motility of vascular endothelial cells**

We have previously purified and cloned ChM-I as an angiogenesis inhibitor from fetal bovine cartilage based on the growth inhibitory activity of vascular endothelial cells (ECs). ChM-I is expressed in the avascular zones of cartilaginous molds and cardiac valves, and has been shown to inhibit the migration, proliferation, and tube morphogenesis of cultured ECs. The aged mice lacking ChM-I exhibit abnormal angiogenesis in cardiac valves, suggesting the essential role of ChM-I in maintaining the tissue avascularity. Despite these evidences showing the activity of ChM-I *in vivo* and *in vitro*, the molecular mechanism of the ChM-I actions remains to be elucidated. To address this issue, we have prepared recombinant human ChM-I (rhChM-I) and examined its effects on migration of ECs, an early regulatory step in angiogenesis. In a modified Boyden chamber assay, ChM-I inhibited the chemotactic migration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) as well as by Fibroblast Growth Factor-2 and Insulin-like Growth Factor-I. The inhibitory action involved the disturbed reorganization of actin cytoskeleton and focal adhesions in VEGF-A-stimulated ECs. We found that rhChM-I suppressed the VEGF-A-induced activation of Rac1 and the phosphorylation of cofilin, which leads to the dysregulation of actin polymerization. Consistent with these observations, time-lapse microscopic analysis revealed that ChM-I inhibited the persistent extensions of lamellipodia and evoked frequent alterations of moving front, coincident with the reduced motility and directionality of ECs upon VEGF-A stimulation. These data showed that ChM-I impaired the VEGF-A-stimulated motility of ECs through the destabilization of lamellipodial extensions. The inhibitory action was selective to the endothelial cell type, but not to the other cell types such as fibroblastic cells, suggesting that ChM-I acts through a endothelial cell-specific signal pathway that regulates the motility of ECs.

### **(2) The analysis of domain structure of ChM-I**

ChM-I (120 amino acids in human and mouse) is a glycoprotein consisting of the N-terminal hydrophilic domain with an N-glycosylation site (domain 1), and a hydrophobic cysteine-rich domain located at the C-terminus (domain 2). Domain 2 is well conserved across species and is highly similar to the C-terminal cysteine-rich domain of Tenomodulin (Tnmd), a ChM-I related angiogenesis inhibitor. Using a glycosylated form of recombinant human ChM-I (G-hChM-I) expressed in CHO cells or 293-F cells, we have demonstrated the various bioactivities of ChM-I on chondrocytes and vascular endothelial cells. On the other hand, the non-glycosylated form of human ChM-I expressed in *E. coli* (NG-hChM-I) exhibited the similar bioactivity, but the activity was distinctly lower than that of G-hChM-I. Truncation of the domain 1 containing the N-glycosylation site by limited digestion with V8 protease had no apparent effect on the bioactivity of NG-hChM-I, indicating that domain 2 is an active domain of this protein. Circular dichroism (CD) measurements revealed that N-glycosylation in domain 1 is critical for the structural integrity for biological function as well as the protein solubility. Current works focus on the analysis of active domain of ChM-I using its mutant proteins and synthetic peptides. So far, no sequence and structural similarity of ChM-I and Tnmd to any known angiogenesis inhibitor has been reported. Thus, the active domain of ChM-I is expected to be a novel anti-angiogenic peptide drug with promising activity for the angiogenesis-related diseases including solid tumors



and rheumatoid arthritis.

## 2. Conversion of tenocytes into chondrocytes by Sox9 overexpression.

Progenitors for the tendons, ligaments, cartilage, and bone are all derived from the same origins including the sclerotome, lateral plate mesoderm, and neural crest. These progenitor populations migrate and populate their prospective regions to give rise ultimately to each primordium. During limb formation, lateral mesoderm-derived tendon and ligament progenitors, as well as chondroprogenitors, express a key transcription factor for chondrogenesis, Sox9. Upon cell-fate determination, Sox9 expression is markedly upregulated in chondroprogenitors and promotes the progression of chondrogenic differentiation, whereas in tendon and ligament progenitors this expression diminishes upon cell differentiation. We demonstrate that Sox9 mediates the direct conversion of tenocytes to chondrocytes through an intermediate state in which both differentiation programs are active. Sox9 is abundantly expressed in cartilage but is undetectable in limb tendons that express *Scleraxis* (*Scx*) and *Tenomodulin* (*Tnmd*), tendon-specific early and late molecular markers, respectively. Upon forced expression of Sox9 in the chick forelimb, ectopic cartilage formation is preferentially observed in fibrous tissues including the tendons, ligaments, perichondrium/periosteum, dermis, and connective tissues in muscle. *Tnmd* expression in tenocytes isolated from the limb tendons was found to be markedly upregulated by forced expression of basic helix-loop-helix activators including *Scx*, *Paraxis*, *Twist1* and *Twist2*. In contrast, the overexpression of Sox9 in monolayer tenocytes resulted in the downregulation of *Tnmd* and *Scx* expression during passaging in culture, and the induction of cartilage molecular markers such as *type II collagen* (*Col2a1*) and *Chondromodulin-I* (*ChM-I*). This Sox9-driven switching from a tenocytic to a chondrocytic gene expression profile was found to be associated with a dramatic change from a spindle to a polygonal cellular morphology. The extracellular accumulation of cartilage-characteristic proteoglycans was also observed. These data suggest that tenocytes have a strong potential for conversion into chondrocytes through the activities of Sox9 both *in vitro* and *in vivo*.

## 3. Analysis of the anti-angiogenic property of the cartilaginous bone primordia during endochondral bone formation

During endochondral bone formation, vascular invasion initiates the replacement of avascular cartilage by well-vascularized bone and bone marrow. Vascular invasion into the cartilaginous bone primordium occurs in a strictly spatio-temporally defined manner, but the molecular mechanism for this process is still poorly understood. By utilizing a VEGF-A mediated gain-of-function approach in mouse and chick models, we investigated the cellular and molecular events associated with angiogenic switching during endochondral bone formation. Cartilage-specific overexpression of VEGF-A<sub>164</sub> in transgenic mice results in the hypervascularization of soft connective tissues away from cartilage. Unexpectedly, perichondrial tissue remained avascular in addition to cartilage. Hypervascularization of soft tissues similarly occurred when various VEGF-A splicing variants (VEGF-A<sub>122</sub>, VEGF-A<sub>146</sub>, VEGF-A<sub>166</sub>, VEGF-A<sub>190</sub>) were overexpressed in the chick forelimb, but perichondrial tissue and cartilage were completely devoid of blood vessels. However, following formation of the bony collar in the middle of cartilaginous bone primordia, anti-angiogenic properties in perichondrial tissue were lost and perichondrial angiogenesis was accelerated by VEGF-A<sub>146</sub>, VEGF-A<sub>166</sub>, or VEGF-A<sub>190</sub>. Once the perichondrium was vascularized, osteoclast precursors were recruited from the circulation to the bony collar to differentiate into MMP9 positive osteoclasts and then the induc-



tion of MMP9 and MMP13 was observed in association with the activation of TGF- $\beta$  signaling. Neither perichondrial angiogenesis nor the subsequent cartilage vascularization was accelerated by the non-heparin-binding VEGF-A<sub>122</sub> or by the VEGF-A<sub>166</sub> $\Delta$ E<sub>162</sub>-R<sub>166</sub> lacking a neuropilin-binding motif. Thus, perichondrial angiogenesis is a prerequisite event for the subsequent vascular invasion into cartilage and is differentially regulated by VEGF-A isoforms.

#### 4. Live imaging of avascular cartilage formation in zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) is a powerful tool to analyze vertebrate embryogenesis due to the optical transparency of the living embryos. We analyze tissue-tissue interactions between cartilage and blood vessels during zebrafish embryonic development by live imaging of fluorescent transgenic zebrafish lines. Cartilage-specific expression of mouse *col2a1* gene is regulated by the SRY box-9 (*Sox9*)-binding 48 bp enhancer element in the first intron of the gene. Taking advantage of Tol2 transposon and *Zebrafish enhancer detection (ZED)* vector containing four tandem repeats of 48 bp *col2a1* enhancer element, we have established a transgenic zebrafish line, *col2a1 : GFP* (Fig. 1a-d). In *col2a1 : GFP* at 2 days post fertilization (dpf), GFP expression was detected in cartilaginous elements such as pharyngeal arch and pectoral fin (Fig. 1b). Even at 21 dpf, EGFP was still detected in cartilaginous elements of *col2a1 : GFP* larvae (Fig. 1d). For visualization of the vascular network, we have also established a transgenic fish line, *flkl : mCherry* (Fig. 1e-h) that express red fluorescent protein, mCherry, under the control of promoter/enhancer elements of zebrafish *flkl/vegfr2* gene. We then obtained double transgenic *col2a1 : GFP ; flkl : mCherry* by crossing *col2a1 : GFP* with *flkl : mCherry*. These double transgenic *col2a1 : GFP ; flkl : mCherry* enabled us to monitor both cartilage and blood vessel formation simultaneously. With confocal laser microscopy, we are currently investigating avascular cartilage formation focusing on pectoral fin formation (Fig. 1i-k).

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

- Miura, S., Kondo, J., Kawakami, T., Shukunami, C., Aimoto, S., Tanaka, H., and Hiraki, Y.: Synthetic disulfide-bridged cyclic peptides mimic the anti-angiogenic actions of chondromodulin-I. *Cancer Sci.* **103**(7): 1311-1318 (2012)
- Takimoto, A., Oro, M., Hiraki, Y., and Shukunami, C.: Direct conversion of tenocytes into chondrocytes by Sox9. *Exp. Cell Res.*, **318**(13): 1492-1507 (2012)
- Alberton P, Popov C, Prägert M, Kohler J, Shukunami C, Schieker M, Docheva D.: Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. *Stem Cells Dev.*, **21**(6): 846-58 (2012)
- 開 祐司: 他人事ではない「科学 vs 技術」と私達・2011 年. 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 龍谷大学人間・科学・宗教オープンリサーチ・センター「死生観と超越 — 仏教と諸科学の学際的研究」2011 年度報告書龍谷大学: 226-235 (2012)

## 2) 著 書

開 祐司：Chondromodulin ファミリー. 「血管新生研究の最先端」(佐藤靖史編, 医薬ジャーナル社, 大阪)印刷中

---

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

川津正慶：歯根膜における Scleraxis の発現と矯正歯の移動による変化の解析. 第 13 回運動器科学研究会 (2012.9.14. 京都)

川津正慶, 宿南知佐, 滝本 晶, 岩崎将也, 清流正弘, 池田悦子, 山本照子：矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜における Scleraxis の機能解析. 第 71 回日本矯正歯科学会 (2012.9.27. 盛岡)

川津正慶：歯根膜における Scleraxis の発現と矯正歯の移動による変化の解析. 第 9 回 Skeletal Research Meeting (2012.11.10. 京都)

杉本由紀, 滝本 晶, 秋山治彦, 中村孝志, 開 祐司, 宿南知佐：腱・靱帯付着部形成における Scx/Sox9 陽性細胞の役割. 第 15 回骨発生・再生研究会 (2012.11.10. 東京)

滝本 晶：Sox9 による腱細胞から軟骨細胞への分化転換. 第 13 回運動器科学研究会 (2012.9.15. 京都)

#### 2) 講演・シンポジウム

宿南知佐：腱・靱帯形成とその制御, 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 シンポジウム 6 「筋/腱/靱帯研究」 (2012.7.21. 東京)

宿南知佐：腱・靱帯形成の分子メカニズム, 第 22 回弘前大学整形外科 夏の研修会 (2012.8.3. 弘前)

滝本 晶：歯根膜における Scleraxis の発現とその制御, 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 若手シンポジウム外科「運動器のリモデリングと再生」(2012.7.19. 東京)

## 生体材料学分野 Department of Biomaterials

分野主任 教授 田畑 泰彦

Prof. Yasuhiko Tabata

### 【研究概要】

本研究分野の目的は、医療(治療、診断、予防)に応用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料(バイオマテリアル)とは、体内で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの生体成分と直接接触した状態で用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらのコンポジットからなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物医学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生治療(一般には、再生医療と呼ばれている)および再建外科治療に用いられる医用材料、人工臓器のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断(分子イメージング)効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進めている。

再建外科治療をアシストする生体材料の生体適合性はまだまだ低く、その代行できる生物機能も単一であることから、臨床上、患者に高い Quality of Life (QOL) を与えることが困難である場合が多い。また、臓器移植もドナー不足に加えて、免疫拒絶抑制剤の副作用にともなう問題もある。このように、再建外科と臓器移植との現在の2大先端外科治療に限界が見えてきている。このような状況の中で生まれてきたのが再生治療である。再生治療とは、細胞の増殖・分化能を活用、生体本来のもつ自然治癒力を介して、病気を治療しようという試みである。この再生治療の試みが医療応用できるようになれば、再建外科と臓器移植治療に続く第3の治療法となることは疑いない。この再生治療は生体材料に依存しない点、免疫抑制剤を必要としない点で、前述の2大治療法とは大きく異なる。再生治療の目的は、細胞の増殖分化能力を利用した生体組織の再生誘導と臓器機能の代替による病気の治療である。この実現には、再生現象にかかわる増殖・分化ポテンシャルの高い(幹)細胞とその周辺環境の基礎生物医学研究が必要であることはいうまでもないが、それに加えて、細胞の増殖、分化を促し、生体組織の再生を誘導するための環境(場)を与えることが不可欠である。別な言い方をすれば、再生治療とは、細胞やその周辺環境をうまく設定することによって、本来、体のもっている自然治癒力を高めて、病気の治療を行うという、体にやさしい理想的な治療法である。この生体組織(Tissue)の再生誘導の場を構築するための医工学(Engineering)的な技術・方法論が生体組織工学(Tissue Engineering)である。

生体組織工学の基本アイデアは、生体組織の構成成分である細胞、細胞の増殖・分化のための足場、および生体シグナル因子(細胞増殖因子と遺伝子)をうまく組み合わせることで、生体組織の再生誘導を実現することである。このためには生体材料の利用が必要不可欠であり、特に、体内で分解吸収され消失する材料(生体吸収性材料)と3つの要素とを組み合わせ、生体組織の再生を誘導する。この再生誘導に適切な生体吸収性を金属やセラミックスにもたせることは難しく、この観点から、生体組織工学では主として高分子材料が利用されている。生体吸収性材料の利点は、材料の体内での役割が果たされた後に、その場から消失するため、再び取り除く必要がなく、また、材料が吸収されるために、材料が生体組織・臓器の再生過程を妨げないことである。生体材料が生体

組織の再生修復とともに吸収されれば、材料に対する問題となる生体反応の心配もなく、また、生体材料が体内に存在する細胞を活性化し、病気を治すことができれば、免疫拒絶反応もなく、理想的な治療法となる。DDS(ドラッグデリバリーシステム、薬物送達法)および生物医学研究のための材料にも生体吸収性が要求される場合が多い。

本研究分野では、生体吸収性の高分子材料を中心とした生体組織・臓器の再生治療のための生体材料、薬物、遺伝子治療、予防、診断、などに必要な DDS のための生体材料、分子生物学、生化学、細胞生物学、細胞培養、および幹細胞研究(再生研究)のための生体材料、あるいは外科および内科治療補助のための生体材料の研究を行っている。以下にその内容をより詳しく述べる。

## 1) 生体組織の再生治療のための生体材料

血液細胞以外のほとんどの細胞は、体内では細胞外マトリックス(タンパク質と多糖からなる3次元のハイドロゲル様構造体)と呼ばれる増殖・分化のための足場材料に接着して存在、その生物機能を発現している。そのため、生体組織が大きく欠損した場合には、この足場も失われるため、欠損部に細胞のみを補うだけでは生体組織の再生誘導を望めない場合が多い。そこで、再生誘導を期待する部位に細胞の増殖・分化を促すための仮の足場を与える必要がある。本研究分野では、この細胞の足場としての3次元あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体(人工細胞外マトリックス)をデザイン、創製している。しかしながら、いかに足場が優れていても、細胞の数が少なかったり、細胞を増殖させるための生体シグナル因子が足りなければ、生体組織の再生誘導は望めないであろう。このような場合、細胞の増殖・分化を促す細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を用いるのが1つの現実的な解決法である。しかしながら、これらの生体シグナル因子は体内での寿命が短く不安定であるため、その利用には投与上の工夫が必要である。この工夫がDDSである。たとえば、生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ、再生部位で徐々に放出(徐放)する。この徐放化技術によって、生体シグナル因子の生物活性が効率よく発揮され、その結果として、種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている。現在、この細胞増殖因子の徐放化技術を利用した血管、骨、歯周組織などの再生誘導治療の臨床研究が始まっている。本研究分野では、再生治療に必要不可欠な細胞足場および徐放化担体のための生体材料をデザイン、創製している。

一般に、拡張型心筋症、慢性腎炎、肝硬変、肺線維症など慢性疾患では、病的部位が線維性組織で占められ、臓器機能が不全に陥っていることが多い。そこで、内科的な薬物、遺伝子治療によって、この線維性組織を消化分解することができれば、周辺の正常組織の再生誘導能によって病的部位は再生修復され、慢性線維性疾患の内科的な再生治療が実現できる。本研究分野では、このアイデアを基に病的部位への薬物・遺伝子のターゲティングおよび局所徐放化による難治性慢性線維性疾患に対する内科的再生治療を行っている。この再生治療の概念は、体のもつ自然治癒力を活用するという点で、上述の足場やDDS技術を用いた外科的再生治療と同じであり、今後は外科治療だけでなく、内科治療に対しても、重要となっていくであろう。例えば、自然治癒力を高めて、難治性慢性疾患の悪化進行を抑制することができれば、患者への福音はきわめて大きいと考えられる。

## 2) 幹細胞工学および基礎生物医学研究のための生体材料

再生治療には、2つのアプローチがある。1つは前述の生体組織工学をベースとした生体組織の再生治療である。もう1つが、増殖・分化ポテンシャルの高い幹細胞を利用する細胞移植治療である。後者のためには、臨床応用可能な十分な数と質のそろった細胞を調製することが重要となる。本研究分野では、この細胞移植治療に不可欠である幹細胞、前駆細胞、および芽細胞などを効率よく得ることを目的として、それらの細胞の単離、増殖、分化のための培養基材および培養技術について研究開発を行っている。従来の細胞培養法に加えて、種々の生体材料からな



る培養基材あるいは培養装置(バイオリアクタ)の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、単に再生治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけではなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の基礎研究(再生研究)にも応用できる生体材料、技術、方法論を提供することも大きな目的である。この技術は細胞を用いた薬の代謝、毒性を評価する創薬研究にも応用できる。加えて、細胞機能の解析および細胞の遺伝子改変を目的として、遺伝子導入、発現のための非ウイルスキャリアーのデザインと創製を行っている。これらの細胞に対する生体材料技術は、前項1)の治療の目的にも利用できる。

幹細胞を利用した細胞移植治療では、時として、細胞の再生誘導能力不足が問題となる場合がある。これを解決する1つの方法として、遺伝子導入による幹細胞の活性化(遺伝子による機能改変)が有望であり、広く行われている。これまでに、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入が行われているが、ウイルスを用いていることから、その臨床応用はきわめて難しい。そこで、非ウイルスキャリアを用いた幹細胞の生物機能の活性化法の研究開発が強く望まれている。この1つの成果として、遺伝子を幹細胞内で徐放化する技術を開発した。この技術を利用することによって、ウイルスと同程度あるいはそれよりも高いレベルの遺伝子発現が実現できた。さらに、遺伝子により活性化した幹細胞を用いることによって、より高い細胞移植治療効果が認められることがわかった。また、遺伝子と非ウイルスキャリアとが固定化された基材上で細胞を培養、さらにバイオリアクタを組み合わせることによって、細胞への遺伝子導入発現効率を高める(SubFection: substrate-mediated transfection)技術も開発した。非ウイルス性キャリアを用いて、プラスミドDNAやsiRNAを細胞内に効率よく取り込ませ、細胞の生物機能や分化を制御することも可能となっている。これらの一連の物質導入技術は、細胞の生物機能の改変に有用であり、その対象となる物質は遺伝子だけでなく、small interfering RNA (siRNA)などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などの細胞内導入法としても利用可能である。

体の最小単位は細胞であるが、生体機能の単位は細胞の集合体である。そのため、細胞集合体に関する研究が始まっている。しかしながら、細胞集合体サイズの増大にともない、集合体内部の細胞は酸素、栄養の供給が悪く、死滅、細胞機能の維持が困難となる。このような状況では細胞研究の発展は望めない。加えて、細胞集合体を利用した薬の開発、毒性評価(創薬研究)に対して限界が生じる。この問題を解決する方法として、生体吸収性ハイドロゲル粒子を細胞集合体内に含ませることを考えた。この方法により、細胞集合体内での状態が改善、細胞機能の向上が認められた。このような、細胞集合体に代表される細胞による組織化のための研究ツールの研究開発も進んでいる。

### 3) ドラッグデリバリーシステム(DDS)のための生体材料

薬物が効くのは、薬物がその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因となっている。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これがDDSである。DDSの目的は、薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、生体材料学の観点からの治療薬物と治療遺伝子のためのDDS研究を行っている。

これまでの研究の経緯から、DDSの対象薬物は治療薬に集中していた。DDSの基本アイデアは、生物活性をもつ物質を全て薬物と考え、これらの物質と生体材料とを組み合わせることで、物質の生物活性を高めることである。つまり、DDSの対象となる薬物は、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などを含んでいる。われわれは、このような基本アイデアからDDSを考え、これを実現するための材料、技術、方法論

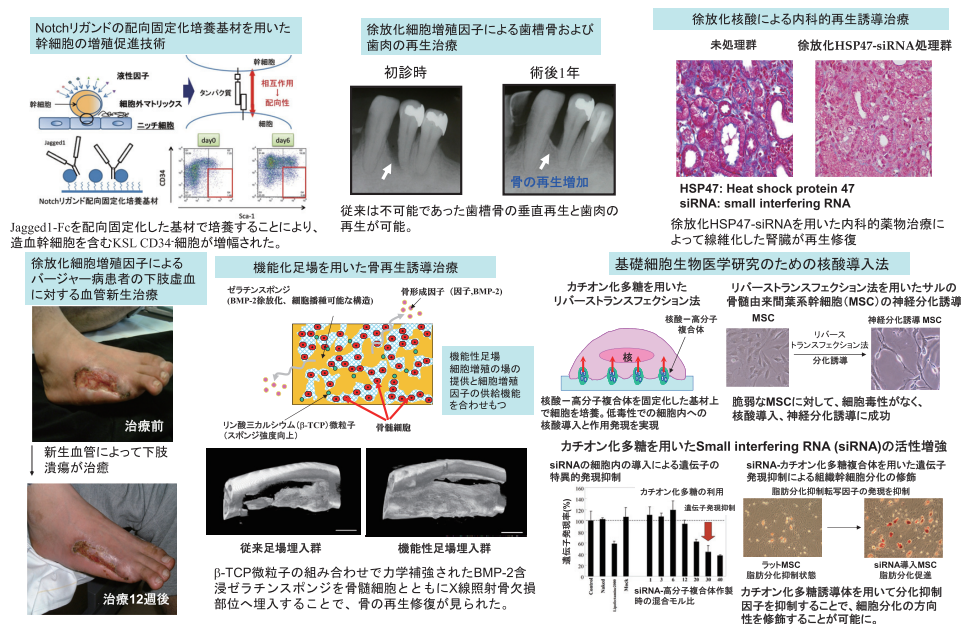
についての研究開発を進めている。例えば、全身あるいは局所粘膜ワクチン薬、および核磁気共鳴イメージング (MRI)、超音波診断薬などに対して、DDS 技術を適用すれば、予防ワクチンおよび診断効果は高まる。また、化粧品、ヘルスケア成分への DDS 技術の適用は、それらの生物効果を高めることができる。このように、DDS とは、生物活性をもつ全ての物質に適用でき、自然科学領域において普遍的な技術である。生物作用をもつ物質の徐放化、可溶化、安定化、およびターゲティングなどの DDS 技術、方法論についても研究を進め、物質活性の増強を目指している。

#### 4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子、金属、セラミックス、およびそれらの複合材料を医療に応用していくという、本研究所の前身である生体医療工学研究センターの材料科学研究の流れを引いている。その中で、生体内で吸収する性質をもつ高分子材料を中心として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

上記の研究内容について、材料科学的な観点から、基礎および応用研究を行っている。得られた研究成果を基に、様々な生体組織、臓器(皮膚、骨、心臓冠動脈、脂肪、軟骨、神経、歯周組織、毛髪、心筋、腎臓など)の再生誘導のメカニズムの解明、その臨床応用、あるいは DDS 技術、方法論を用いた薬物治療、予防、診断などについて、医学部、歯学部、獣医学部、企業との共同研究を通じた、応用研究を展開している。加えて、得られた材料や技術の生物医学の基礎研究への応用についても共同研究を通して検討を進めている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic researches of biology and medicine from the viewpoint of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomedical materials and biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers, metals, ceramics, and their composites, are being designed and created aiming at their clinical applications as well as the development of experimental tools necessary for basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine. We are actively proceeding re-



search and development (R & D) of biomaterials to assist reconstructive surgery and apply to drug delivery systems (DDS) for improved therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials applied are of poor biocompatibility and functional substitutability. For organ transplantation, there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the adverse effects of immunosuppressive agents. The two advanced medical therapies currently available are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential. In these circumstances, a new therapeutic trial, in which disease healing can be achieved based on the natural healing potential of patients themselves, has been increasingly expected. This is termed the therapy of regenerative medicine where the regeneration of tissues and organs is naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially manipulating the cell potentials of proliferation and differentiation. The objective of regenerative therapy is to regenerate injured or lost tissues and substitute organ functions by making use of the natural self-healing potential of patients themselves. The therapy of regeneration medicine is quite different from the reconstructive surgery and organ transplantation from the viewpoint that neither biomaterials and medical devices nor immunosuppressive agents are needed. The basic idea of regeneration therapy is to give cells a local environment which is suitable to promote their proliferation and differentiation, resulting in the cell-based induction of tissue and organ regeneration. It is tissue engineering that is a biomedical technology or methodology to create this environment for the natural induction of tissue regeneration. Generally, there are three factors necessary to induce tissue regeneration, such as cells, the scaffold for cell proliferation and differentiation, and biosignaling molecules of growth factors and the related gene, which are fundamentally 3 components constituting the body tissue. For successful regenerative therapy of tissue and organ, it is indispensable to efficiently combine various biomaterials with the body components. Among biomaterials, biodegradable biomaterials play an important role in this medical applications. Since there are few metals and ceramics with biodegradable nature, polymer materials of biodegradability are generally preferable for this purpose. The combination of polymers with metals or ceramics is effective in preparing material composites of suitable biodegradability. If a biomaterial is degraded to disappear in the body, it is not always necessary to retrieve the material from the body after the function expected is accomplished. In addition, the material should be degraded at the right time profile not to physically impair the natural process of tissue regeneration by the material remaining. Biodegradable biomaterials well-designed are indispensable for the research and development (R&D) of regeneration therapy, DDS or the basic research of cell biology and medicine (regeneration research).

Our research goal is to design and create biomaterials from polymers and the composites with metals or ceramics which are practically applicable for regeneration therapy, stem cell technology, DDS, and medical therapy of reconstructive surgery and internal medicine. More detailed explanation about every project is described.

### **1) Biomaterials for Regeneration Therapy**

It is well recognized that cells are present in the living tissue interacting with the extracellular matrix (ECM) of natural scaffold for their proliferation, differentiation, and morphogenesis. When the body tissue is largely lost, the ECM itself also disappears. In such a case, only by supplying cells to the defect, we cannot always expect the tissue regeneration at the large defect. One of the possible ways to achieve successful tissue regeneration is to pro-

vide a temporary scaffold for the proliferation and differentiation of cells to the defect. We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as this temporary cell scaffold which is an artificial ECM. However, if the number of cells and the amount of biosignaling molecules are not large enough to promote the cell activities, only the supply of a scaffold to the tissue defect will not induce the tissue regeneration. As one trials to break through the situation, it practically possible to make use of growth factors for promoted proliferation and differentiation of cells. It is, however, necessary for in vivo use of growth factors to contrive their administration form because of the in vivo short half-life and instability. One possible answer for that is to use the controlled release of growth factor or the related gene at the tissue site to be regenerated over an extended time period by incorporating the factor or gene into an appropriate carrier. This release technology enables the growth factor to efficiently enhance the biological activity, resulting in promoted cell-induced tissue regeneration. We are designing and preparing the biodegradable carrier of growth factors and genes from gelatin and its derivatives. A new therapy to naturally induce tissue and organ regeneration by the controlled release of various biologically active growth factors has been achieved and the therapeutic potentials have been scientifically demonstrated through animal experiments. Among the tissue regeneration trials, clinical experiments of angiogenic and bone regeneration therapies have been started by the controlled release technology of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF)-1, and platelet-rich plasma (PRP) to demonstrate the good therapeutic efficacy.

Generally, in the chronic fibrotic disease, such as diluted cardiomyopathy, liver cirrhosis, lung fibrosis, and chronic nephritis, the damaged portion of organ is often occupied with the fibrous tissue, which often causes organ dysfunction. It is highly possible that if the fibrosis is enzymatically digested by a proper way, the fibrotic site is naturally regenerated and repaired on the basis of the inherent regenerative potential of the surrounding normal tissue and consequently the organ function is regenerated and recovered. The systems of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity are being designed and prepared to achieve the regeneration therapy for chronic disease based on the natural healing potential of patients. Based on the drug administration therapy which has been clinically used in internal medicine, this is called as physical regenerative therapy of internal medicine. This is a therapeutic approach which is different from the conventional regenerative therapy of surgery where cells, the scaffold, and signal molecules or the combinations are surgically applied to a tissue defect for regeneration induction thereat. The two surgical and physical regeneration therapies are conceptually identical from the viewpoint of the positive use of natural healing potential. In addition, the basic idea of regenerative therapy will be combined with internal medical therapy to open a new therapeutic field in the future. For example, the combination with aneurysm catheter therapy has been tried, and consequently the aneurysm occlusion by the regenerated tissue-based organization has been succeeded by the bFGF release system. On the other hand, a new cell culture technology is being developed to enhance the cellular expression level of nucleic acid compounds, such as decoy DNA and small interfering RNA (siRNA), with non-viral gene carriers.

## **2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Basic Researches of Cell Medicine and Biology (Regeneration research)**

There are two approaches to realize regeneration medical therapy. One is the tissue engineering-based therapeutic approach described above. The other is the transplantation therapy of cells which have a potential to induce tissue regeneration. For the latter approach, it is of prime importance to efficiently obtain and prepare cells with a

high potential of proliferation and differentiation, such as stem cells, precursors, and blastic cells. In this department, the technology and methodology of cell culture with various biomaterials and bioreactors have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blastic cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. They are also applicable for the research of drugs discovery to evaluate their metabolism and toxicity. In addition, non-viral vectors for plasmid DNA and siRNA have been investigated to design the DDS system for gene transfection which can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy. For example, a new system for the controlled release of plasmid DNA inside cells has been developed to succeed in enhancing the level of gene transfection and the consequent gene expression as high as or higher than that of viral vector system. In addition, a new technology of cell culturing on plasmid DNA-coated substrates has been designed and enhanced the level of gene expression as well as prolonged the expressed period. This reverse transfection system (SubFection : substrate-mediated transfection) was effective in the gene transfection for stem and matured cells which have not been readily transfected by the conventional method. This can be applied for the cell internalization of low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA). We cannot only enhance the biological activities of plasmid DNA and siRNA with the non-viral vectors for stem cells, but also modify their biological functions and differentiation fate.

The minimum unit of body is cell, but that of biological function is the cell aggregate. The cell culture with cell aggregates has been noted for the basic research of cells and drug discovery (the drug development and the toxicity evaluation). However when the size of cell aggregates becomes larger, the cells in the aggregates tend to die because of the lack of nutrients and oxygen. This cell death often courses the discontinuation of cell researches. To break through the problem, biodegradable hydrogel microspheres were tried to incorporate into the cell aggregate. The microspheres incorporation enabled cells to improve their function even in the cell aggregate. This technology is one of the key methods to generate the cell-based tissue-like structure in vitro.

### 3) Biomaterials for DDS

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their in vivo therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is a biomaterial-technology which allows a drug to act at the right time the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolongation of drug life-time, the acceleration of drug permeation and absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. In this department, various research projects of DDS for drug and gene therapies have been being carried out from the viewpoint of polymer material sciences. Our definition of “drug” is not limited only to therapeutic substances, but the drug includes every substance which has a certain biological activity and function, such as diagnostic and preventive drugs, cosmetics, and health care substances etc. The DDS technology and methodology can be also applied for preventive and diagnostic substances to enhance the in vivo efficacy of vaccination and diagnosis, such as magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnosis or molecular imaging. We are developing DDS technology and methodology which are applicable to the re-



search and development of cosmetics and health care sciences. The basic idea of DDS is to efficiently enhance the biological functions of a certain substance by the combination with biomaterials. DDS is defined as an universal technology or methodology which can apply to every research field of natural sciences.

#### 4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

This department is partly originated from the division of Molecular Design and Biomaterials of the former Research Center for Biomedical Engineering where the medical applications of polymer materials have been investigated extensively. Among the research activities, we continue to molecularly design and create biomaterials mainly from biodegradable polymers aiming at the development of assistant materials in surgical and physical therapies.

From the viewpoint of biomaterial sciences, we are actively proceeding comprehensive biological and medical researches on the scaffold for the cell proliferation and differentiation, the DDS of growth factors and the related genes, and the material-based technology or methodology to use stem, precursor, and blast cells or in addition, their medical applications. Through several R&D collaborations with medical, dental, and veterinary schools as well as private companies, we are planning to apply our basic research results to realize the regeneration induction therapy of various tissues and organs, such as the skin, fat, bone, cartilage, nerve, hair, blood vessels, periodontium, myocardium, and kidney. DDS technologies are also being investigated for their applications of therapeutic, prophylactic, and diagnostic medicines. Some biomaterials are necessary and applicable to further develop the basic researches of cell medicine and biology.

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

- Takaoka, R., Hikasa, Y., Hayashi, K., Tabata, Y.: Bone regeneration by lactoferrin released from a gelatin hydrogel. *J Biomater Sciences Polym Eds.* **22**(12): 1581-89(2012)
- Kitamura, C., Nishihara, T., Terashita, M., Tabata, Y., Washio, A.: Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. *International Journal of Dentistry.* **2012**: 1-8(2012)
- Sekiguchi, H., Ii, M., Jujo, K., Renault, M.A., Thorne, T., Clarke, T., Ito, A., Tanaka, T., Klyachko, E., Tabata, Y., Hagiwara, N., Losordo, D.: Estradiol triggers sonic-hedgehog-induced angiogenesis during peripheral nerve regeneration by downregulating hedgehog-interacting protein. *Lab Invest.* **92**(4): 532-42(2012)
- Saito, T., Tabata, Y.: Preparation of gelatin hydrogels incorporating low-molecular-weight heparin for anti-fibrotic therapy. *Acta Biomater.* **8**(2): 646-52(2012)
- Okamoto, S., Ikeda, T., Sawamura, K., Nagae, M., Hase, H., Mikami, Y., Tabata, Y., Matsuda, K., Kawata, M., Kubo, T.: Positive effect on Bone fusion by the combination of platelet-rich plasma and a gelatin  $\beta$ -tricalcium phosphate sponge: A study using a posterolateral fusion model of lumbar vertebrae in rats. *Tissue Eng Part A.* **18**(1-2): 157-66(2012)

- Eto, H., Suga, H., Aoi, N., Kato, H., Doi, K., Kuno, S., Tabata, Y., Yoshimura, K.: Therapeutic potential of fibroblast growth factor-2 for hypertrophic scars: upregulation of MMP-1 and HGF expression. *Lab Invest.* **92**(2): 214-23(2012)
- Liu, J., Jo, J., Kawai, Y., Aoki, I., Tanaka, C., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Preparation of polymer-based multimodal imaging agent to visualize the process of bone regeneration. *J Control Release.* **157**(3): 398-405(2012)
- Kishigami, R., Otsu, K., Oikawa-Sasaki, A., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Tabata, Y., Harada, H.: Histological analysis of epithelial stem cells during induced pluripotent stem cell-derived teratoma development. *J Oral Biosci.* **54**(1): 58-65(2012)
- 田畑泰彦: 体内コミュニケーションを利用したがんターゲティングナノ粒子のデザイン. *実験医学.* **30**(4)3月号: 589-90(2012)
- Peng, L. H., Tsang, S.Y., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Genetically-manipulated adult stem cells as therapeutic agents and gene delivery vehicle for wound repair and regeneration. *J. Control Release.* **157**(3): 321-30(2012)
- Uesugi, Y., Kawata, H., Saito, Y., Tabata, Y.: Ultrasound-responsive thrombus treatment with zinc-stabilized gelatin nano-complexes of tissue-type plasminogen activator. *J Drug Target.* **20**(3): 224-34(2012)
- Sakuraba, H., Fujiwara, N., Sasaki-Oikawa, A., Sakano, M., Tabata, Y., Otsu, K., Ishizeki, K., Harada, H.: Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth. *J Periodontal Res.* **47**(1): 81-88(2012)
- 田島脩平, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲル粒子を用いた細胞集合体の調製. *日本化学繊維研究所講演集.* **69**: 57-64(2012)
- Hussain, A., Bessho, K., Takahashi, K., Tabata, Y.: Magnesium calcium phosphate as a novel component enhances mechanical/physical properties of gelatin scaffold and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A.* **18**(7-8): 768-74(2012)
- Tajima, S., Tabata, Y.: Preparation and functional evaluation of cell aggregates incorporating gelatin microspheres with different degradabilities. *J Tissue Eng Regen Med.* in press
- Fujita, N., Matsushita, T., Ishida, K., Sasaki, K., Kubo, S., Matsumoto, T., Kurosaka, M., Tabata, Y., Kuroda, R.: An analysis of bone regeneration at a segmental bone defect by controlled release of bone morphogenetic protein 2 from a biodegradable sponge composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate. *J Tissue Eng Regen Med.* **6**(4): 291-98(2012)
- Mindemark, J., Tabata, Y., Bowden, T.: Low charge density cationic polymers for gene delivery: Exploring the influence of structural elements on in vitro transfection. *Macromol Biosci.* **12**: 840-48(2012)
- Tadokoro, M., Matsushima, A., Kotobuki, N., Hirose, M., Kimura, Y., Tabata, Y., Hattori, K., Ohgushi, H.: Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* **6**(4): 253-60(2012)
- Tsuchiya, K., Nitta, N., Sonoda, A., Nitta-Seko, A., Ohta, S., Takahashi, M., Murata, K., Mukaisho, K., Shiomi, M., Tabata, Y., Nohara, S.: Evaluation of atherosclerotic lesions using dextran- and mannan-dextran-coated USPIO: MRI analysis and pathological findings. *International Journal of Nanomedicine.* **7**: 2271-80(2012)
- Ratanavaraporn, J., Tabata, Y.: Enhanced osteogenic activity of bone morphogenetic protein-2 by 2-O-desulfated heparin. *Acta Biomater.* **8**(1): 173-82(2012)

- Ratanavaraporn, J., Furuya, H., Tabata, Y.: Local suppression of pro-inflammatory cytokines and the effects in BMP-2-induced bone regeneration. *Biomaterials*. **33**(1): 304-16(2012)
- Negoro, H., Kanematsu, A., Doi, M., Suadican, S.O., Matsuo, M., Imamura, M., Okinami, T., Nishikawa, N., Oura, T., Matsui, S., Seo, K., Tainaka, M., Urabe, S., Kiyokage, E., Todo, T., Okamura, H., Tabata, Y., Ogawa, O.: Involvement of urinary bladder connexin43 and the circadian clock in coordination of diurnal micturition rhythm. *Nat Commun*. **3**: 809(2012)
- Tsuzuki, N., Seo, J.P., Yamada, K., Haneda, S., Tabata, Y., Sasaki, N.: Effect of compound of gelatin hydrogel microsphere incorporated with platelet-rich-plasma and alginate on sole defect in cattle. *J Vet Med Sci*. **74**(8): 1041-44(2012)
- Tsuzuki, N., Otsuka, K., Seo, J., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: In vivo osteoinductivity of gelatin  $\beta$ -tri-calcium phosphate sponge and bone morphogenetic protein-2 on an equine third metacarpal bone defect. *Res Vet Sci*. **93**(2): 1021-25(2012)
- Somamoto, S., Tabata, Y.: An artificial slk-elastin-like protein suppresses cells adhesion without apoptosis. *J Biotechnol Biomater*. **2**(4) in press
- Zhao, Q.Q., Hu, Y.L., Zhou, Y., Li, N., Han, M., Tang, G.P., Qiu, F., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Gene-carried hepatoma targeting complex induced high gene transfection efficiency with low toxicity and significant antitumor activity. *Int J Nanomedicine*. **7**: 3191-202(2012)
- Yamada, H., Mizusawa, K., Igarashi, R., Tochio, H., Shirakawa, M., Tabata, Y., Kimura, Y., Kondo, T., Aoyama, Y., Sando, S.: Substrate/Product-targeted NMR monitoring of pyrimidine catabolism and its inhibition by a clinical drug. *ACS Chem Biol*. **7**(3): 535-42(2012)
- Nakano, T., Kaibara, K., Ishimoto, T., Tabata, Y., Umakoshi, Y.: Biological apatite (BAP) crystallographic orientation and texture as a new index for assessing the microstructure and function of bone regenerated by tissue engineering. *Bone*. **51**(4): 741-47(2012)
- Negoro, H., Kanematsu, A., Matsuo, M., Okamura, H., Tabata, Y., Ogawa, O.: Development of diurnal micturition pattern in mice after weaning. *J Urol*. in press
- 齋木佳克, 菅原由美, 今野美樹, 田林暁一, 山本雅哉, 田畑泰彦: 吸収性大動脈吻合部補強材の臨床応用. *再生医療*. **11**(3): 243-248(2012)
- 田畑泰彦: ハイドロゲル. *再生医療*. **11**(3): 257-259(2012)
- Miyake, Y., Kimura, Y., Ishikawa, S., Tsujita, H., Miura, H., Narazaki, M., Matsuda, T., Tabata, Y., Yano, T., Toshimitsu, A., Kondo, T.: Synthesis and functional evaluation of chiral dendrimer-triamine-coordinated Gd complexes as highly sensitive MRI contrast agents. *Tetrahedron Letters*. **53**(34): 4580-83(2012)
- Sekiguchi, H., Ii, M., Jujo, K., Thorne, T., Ito, A., Klyachko, E., Hamada, H., Kessler, J.A., Tabata, Y., Kawana, M., Asahi, M., Hagiwara, N., Losordo, D.W.: Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve. *Angiogenesis*. in press
- 田畑泰彦: 幹細胞への骨欠損部位へのターゲティング能の付与と骨再生. *実験医学*. **30**(14): 2254-55(2012)
- 畠賢一郎, 田畑泰彦, 出澤真理: 海外再生医療企業のトップに聞く 再生医療産業成功のキーワード. *再生医療*. **11**(3): 6-19(2012)
- 田邊貴史, 都築 直, 徐 鍾筆, 石井三都夫, 山田一孝, 羽田真悟, 田畑泰彦, 佐々木直樹: 乳牛の蹄底潰瘍に対

- する多血小板血漿混合アルギン酸ゲルの蹄底再生効果. 日本獣医師会雑誌. **65**(5): 345-49(2012)
- Akazawa, T., Murata, M., Tazaki, J., Hino, J., Nakamura, K., Yoshinari, S., Tabata, Y., Hanawa, T., Takahata, M., Iwasaki, N., Ito, M., Ohmori, T., Yamachika, H., Kikuchi, M.: Characterization of bio-absorbable and biominetic granules produced from animal bone by the high velocity rotation-crushing and demineralizing technique. *Phosphorus Research Bulletin*. **26**: 65-70(2012)
- Ishikawa, H., Nakamura, Y., Jo, J., Tabata, Y.: Gelatin nanospheres incorporating siRNA for controlled intracellular release. *Biomaterials*. **33**(35): 9097-104(2012)
- Takagi, T., Kimura, Y., Shibata, S., Saito, H., Ishii, K., Okano, H.J., Toyama, Y., Okano, H., Tabata, Y., Nakamura, M.: Sustained bFGF-Release tubes for peripheral nerve regeneration: Comparison with autograft. *Plast Reconstr Surg*. **130**(4): 866-76(2012)
- Nakaguchi, K., Jinnou, H., Kaneko, N., Sawada, M., Hikita, T., Saitoh, S., Tabata, Y., Sawamoto, K.: Growth factors released from gelatin hydrogel microspheres increase new neurons in the adult mouse brain. *Stem Cells International*. **2012**: 7pages(2012)
- Hato, N., Nota, J., Komobuchi, H., Teraoka, M., Yamada, H., Gyo, K., Yanagihara, N., Tabata, Y.: Facial nerve decompression surgery using bFGF-impregnated biodegradable gelatin hydrogel in patients with bell palsy. *Otolaryngo Head Neck Surg*. **146**(4): 641-46(2012)
- Seo, J.P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges. *Res Vet Sci*. **93**(3): 1481-86(2012)
- Huang, B., Tabata, Y., Gao, J.Q.: Mesenchymal stem cells as therapeutic agents and potential targeted gene delivery vehicle for brain diseases. *J Control Release*. **162**(2): 464-73(2012)
- Saito, T., Tabata, Y.: Preparation of gelatin hydrogels incorporating small interfering RNA for the controlled release. *J. Drug Target*. **20**(10): 864-72(2012)
- Negoro, H., Okinami, T., Kanematsu, A., Imamura, M., Tabata, Y., Ogawa, O.: Role of Rev-erb $\alpha$  domains for transactivation of the connexin43 promoter with Sp1. *FEBS Lett*. in press
- Ishimoto, T., Nakano, T., Umakoshi, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Degree of biological apatite c-Axis orientation rather than bone mineal density controls mechanical function in bone regenerated using rBMP-2. *Journal of bone and mineral research*. in press
- Oka, S., Matsumoto, T., Kubo, S., Matsushita, T., Sasaki, H., Nishizawa, Y., Matsuzaki, T., Saito, T., Nishida, K., Tabata, Y., Kurosawa, M., Kuroda, R.: Local administration of low dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for tendon-bone healing in anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng Part A*. in press
- Sato, M., Kawamoto, S., Watanabe, M., Sakamoto, N., Sato, M., Tabata, Y., Saiki, Y.: Medial regeneration using a biodegradable felt as a scaffold preserves integrity and compliance of a canine dissected aorta. *Circulation*. **126**(11 Suppl 1): S102-09(2012)
- Uesugi, Y., Morita, M., Jo, J., Minami, M., Tomita, Y., Yuasa, S., Yano, T., Tabata, Y.: Preparation of molecular probe for photoacoustic tomography diagnosis. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. **6**: 316(2012)
- Fukui, T., Ii, M., Shoji, T., Matsumoto, T., Mifune, Y., Kawakami, Y., Akimaru, H., Kawamoto, A., Kuroda, T., Saito, T., Tabata, Y., Kuroda, R., Kurosaka, M., Asahara, T.: Therapeutic effect of local administration of low-dose

- simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. *J Bone Miner Res.* **27**: 1118-31 (2012)
- Makoto, M., Tabata, Y.: Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. *Acta Biomaterialia.* **8**: 1792-1801 (2012)
- Okamoto, T., Uemoto, S., Tabata, Y.: Prevention of Trinitrobenzene Sulfonic Acid-Induced Experimental Colitis by Oral Administration of a Poly(lactic-co-glycolic Acid) Microsphere Containing Prostaglandin E2 Receptor Subtype 4 (EP4) Agonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **341**: 340-349 (2012)
- Ohno, K., Akashi, T., Tsujii, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Blood clearance and biodistribution of polymer brush-aforded silica particles prepared by surface-initiated living radical polymerization. *Biomacromolecules.* **13** (3): 927-936 (2012)
- Jo, J., Lin, X., Nakahara, T., Aoki, I., Saga, T., Tabata, Y.: Preparation of polymer-based magnetic resonance imaging agent to visualize therapeutic angiogenesis. *Tissue Eng. Part A.* in press
- Sasaki, N., Nishii, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y.: The effect of gelatin hydrogel sheet containing bFGF on proximal sesamoid bone transverse fracture in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science.* in press
- Kitagawa, F., Takei, S., Imaizumi, T., Tabata, Y.: Chondrogenic differentiation of immortalized human mesenchymal stem cells on zirconia microwell substrata. *Tissue Eng Part C Methods.* in press
- Ishimoto, T., Nakano, T., Umakoshi, Y., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Degree of biological apatite c-axis orientation rather than bone mineral density controls mechanical function in bone regenerated using rBMP-2. *Journal of Bone Mineral Research.* in press
- Iwasaki, Y., Katayama, K., Yoshida, M., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Comparative physicochemical properties and cytotoxicity of polyphosphoester ionomers with bisphosphonates. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition.* in press

## 2) 著 書

- 齊藤高志, 田畑泰彦: 低分子化合物のための徐放化ハイドロゲル. *ファインケミカル.* **41** (4): 19-24 (2012)
- 浅原智彦, 田畑泰彦: 5-5-8 ハイドロゲル, スポンジ足場, 遺伝子導入試薬. *先端バイオマテリアルハンドブック.* 541-47 (2012)
- 田畑泰彦: 5-2-1-2 細胞の再生誘導能力を高める新世代型バイオマテリアル. *先端バイオマテリアルハンドブック.* 258-63 (2012)
- 田畑泰彦: 第1章 イメージングとは何か. *最先端材料システム One Point 10 イメージング.* 1-20 (2012)
- 上杉佳子, 田畑泰彦: 徐放技術と外部刺激との組み合わせ: 超音波. 「ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(遺伝子医学 MOOK 別冊) in press
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 細胞-drug ハイブリッド. 「遺伝子医学 MOOK 別冊ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線」(田畑泰彦編, 株式会社メディカルドゥ, 大阪) in press

## 3) 総 説

- 山本雅哉, 丸井 晃, 坂田隆造, 田畑泰彦: 細胞増殖因子徐放化による血管新生治療. *細胞.* **44** (2): 16-19 (2012)
- 坂本達則, 中川隆之, 田畑泰彦, 伊藤壽一: 耳科領域での DDS の臨床応用. *細胞.* **44** (2): 20-22 (2012)
- 田畑泰彦: 骨軟骨再生治療のための組織工学技術の進歩. *Bone Joint Nerve.* **2** (1): 33-38 (2012)



田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療．化学工業．**63**(7): 489-95(2012)

田畑泰彦：血管新生療法におけるバイオマテリアル工学．日本臨床．in press

黒田良祐，福井友章，石田一成，佐々木謙，田畑泰彦：整形外科のための DDS 技術．Drug Delivery System. **27**(4): 283-88(2012)

山本雅哉：細胞足場材料．再生医療．**11**(1): 12-16(2012)

---

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

稲生佳菜子，山本雅哉，田畑泰彦：糖添加により水可溶化するゼラチンハイドロゲル細胞足場の作製．第 61 回高分子年次大会(2012.5.29-31．横浜)

糸岡朝樹，山本雅哉，田畑泰彦：塩基性線維芽細胞増殖因子を傾斜固定化したアルギン酸足場材料内での間葉系幹細胞の培養．第 61 回高分子年次大会(2012.5.29-31．横浜)

Toda, H., Yamamoto, M., Kohara, H., Tabata, Y.: Orientation-regulated immobilization of Jagged1 on cell substrates for ex vivo proliferation of a bone marrow cell population containing hematopoietic stem cells. 9th World Biomaterials Congress(2012.6.1-5. Chengdu)

Inoo, K., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Preparation of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres with the property of sugar-responsive water-solubilization. 9th World Biomaterials Congress(2012.6.1-5. Chengdu)

山本雅哉：細胞培養基材としての刺激応答性ハイドロゲル．第 5 回 NanoBio 若手ネットワーキングシンポジウム(2012.6.8-9. 神戸)

山本雅哉，稲生佳菜子，田畑泰彦：骨形成因子を含浸した糖応答性ゼラチンハイドロゲル粒子を用いた細胞凝集体の作製．第 11 回日本再生医療学会総会(2012.6.12-14. 横浜)

Yamamoto, M., Inoo, K., Tabata, Y.: Fabrication of mesenchymal stem cell aggregates containing sugar-responsive gelatin hydrogel microspheres incorporating bone morphogenetic protein-2. ISSCR 10th Annual Meeting(2012.6.13-16. 横浜)

山本雅哉，稲生佳菜子，高堂泰輔，田畑泰彦：糖応答性ゼラチンハイドロゲル粒子を用いた細胞凝集体内での骨形成因子の徐放化．第 28 回日本 DDS 学会(2012.7.4-5. 札幌)

高堂泰輔，稲生佳菜子，山本雅哉，田畑泰彦：フェニルボロン酸導入ハイドロゲルを組み込んだコラーゲンゲルの作製．第 58 回高分子研究発表会(2012.7.13. 神戸)

Yamamoto, M., Inoo, K., Tabata, Y.: Sugar-responsive water-solubilization of bone morphogenetic protein-2-incorporating gelatin hydrogel. 3rd TERMIS World Congress(2012.9.5-8. Vienna)

山本雅哉，稲生佳菜子，高堂泰輔，田畑泰彦：糖応答性ゼラチンハイドロゲル粒子を用いた細胞凝集体内での細胞増殖因子の徐放化．平成 24 年度繊維学会秋季研究発表会(2012.9.25-26. 福井)

Yamamoto, M., Inoo, K., Kodo, T., Tabata, Y.: Controlled release of growth factors in mesenchymal stem cell aggregates containing sugar-responsive gelatin hydrogel microspheres. BMES 2012 Annual Meeting(2012. 10.24-27. Atlanta)

齊藤高志，田畑泰彦：活性型ビタミン D3 徐放化ゼラチンスポンジ内での骨髄間葉系幹細胞の骨分化．第 61 回高

分子学会年次大会(2012.5.29. 神奈川)

齊藤高志, 田畑泰彦:ゼラチンスポンジを用いた骨髄間葉系幹細胞の分化培養による骨／軟骨界面の構築. 第11回日本再生医療学会総会(2012.6.24. 神奈川)

齊藤高志, 田畑泰彦:鉄キレート剤徐放化ハイドロゲルによる組織の低酸素誘導と血管新生. 第41回医用高分子シンポジウム(2012.6.25. 東京)

齊藤高志, 田畑泰彦:骨髄間葉系幹細胞の骨分化のための活性型ビタミン D3 徐放化ゼラチンスポンジ調製. 第33回日本炎症・再生医学会(2012.7.5. 福岡)

齊藤高志, Ratanavaraporn, J.,田畑泰彦:ゼラチンスポンジを用いた骨髄間葉系幹細胞の分化培養による骨・軟骨界面構築. 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012(2012.11.26. 仙台)

戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦:幹細胞分化に適した硬さに変化する刺激応答性ハイドロゲルの作製. 第61回高分子年次大会(2012.5.29-31. 横浜)

戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦:Eph シグナルタンパク質を配向固定化した硬さの異なるハイドロゲルによる間葉系幹細胞の培養. 第11回日本再生医療学会総会(2012.6.12-14. 横浜)

Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Preparation of phosphatase-responsible hydrogels capable for the stiffness change associated with mesenchymal stem cell differentiation. International Society for Stem Cell Research 2012 Annual Meeting(2012.6.13-16. Yokohama)

戸田裕之, 山本雅哉, 小原洋志, 田畑泰彦:間葉系幹細胞の分化に適した硬さに変化する刺激応答性ハイドロゲル培養基の作製. 第33回日本炎症・再生医学会(2012.7.5-6. 福岡)

Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Preparation of enzyme-responsible hydrogels to change the stiffness associated with mesenchymal stem cells differentiation. 2012 Annual Meeting of the Biomedical Engineering Society(2012.10.24-27. Atlanta)

戸田裕之, 山本雅哉, 田畑泰彦:ハイドロゲルへの細胞シグナル因子の配向固定化. 第32回日本バイオマテリアル学会シンポジウム(2012.11.26-27. 仙台)

田島脩平, 田畑泰彦:塩基性線維芽細胞増殖因子徐放性ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製. 第61回高分子学会(2012.5.29-31. 横浜)

田島脩平, 田畑泰彦:分解性の異なる生体吸収性ゼラチンハイドロゲル粒子を用いた細胞集合体の作製. 高等研究院生体医工学研究部門・先端医工学研究ユニット研究交流会(2012.6.6. 京都)

田島脩平, 田畑泰彦:塩基性線維芽細胞増殖因子徐放性ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製. 第11回日本再生医療学会(2012.6.12-14. 横浜)

田島脩平, 田畑泰彦:塩基性線維芽細胞増殖因子徐放性ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製. 第33回日本炎症再生医学会(2012.7.5-6. 福岡)

田島脩平, 田畑泰彦:塩基性線維芽細胞増殖因子徐放性ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)

岡本竜弥, 田畑泰彦, 上本伸二:組織再生誘導のための免疫応答制御の試み ~Immuno-bioengineering の創出に向けて~. 第112回日本外科学会定期学術集会(2012.4.12-14. 幕張(千葉))

岡本竜弥, 岡本晋弥, 田畑泰彦, 上本伸二:Prostaglandin E2 誘導体及びその生体分解性高分子修飾による免疫応答制御の試み. 第49回日本小児外科学会学術集会(2012.5.14-16. 横浜(神奈川))

Okamoto, T., Tabata, Y., Uemoto, S.: Prevention of TNBS-induced experimental colitis by oral administration of a

- PLGA microsphere containing Prostaglandin E2 Receptor Subtype 4(EP4) agonist. Digestive Disease Week 2012(2012.5.19-22 San Diego(California, USA))
- Okamoto, T., Okamoto, S., Tabata, Y., Uemoto, S.: Suppression of allogenic acute rejection by systemic administration of Prostaglandin E2 receptor subtype 4(EP4) Agonist in experimental rat heart-lung transplantation. British Association of Pediatric Surgeons(BAPS)59th annual congress(2012.6.14-16 Rome(Italy))
- Okamoto, T., Okamoto, S., Tabata, Y., Uemoto, S.: Suppression of allogenic acute rejection by systemic administration of Prostaglandin E2 receptor subtype 4(EP4) agonist in experimental rat heart-lung transplantation. International Pediatric Transplantation Association(IPTA)Regional Education Meeting 2012(2012.9.23 名古屋(愛知))
- Hirai, K., Tabata, Y., Sakai, Y.: Enhanced intestinal anastomotic healing with gelatin hydrogel sheet incorporating basic fibroblast growth factor. 47th Annual Congress of the European Society for Surgical Research(2012.6.6-9 Lille)
- 平井健次郎, 坂井義治, 田畑泰彦: 徐放化 bFGF ゼラチンシートを用いた腸管吻合部創傷治癒促進効果の検討. 第 11 回日本再生医療学会(2012.6.12-14. 横浜)
- 平井健次郎, 田畑泰彦, 坂井義治: 徐放化 bFGF による腸管吻合部創傷治癒促進効果の検討. 第 67 回日本消化器外科学会総会(2012.7.18-20. 富山)
- 中村陽子, 河合勝也, 森本尚樹, 鈴木茂彦, 田畑泰彦: bFGF とストロマ細胞由来因子の組み合わせ徐放化による血管新生と皮弁生着率. 第 11 回日本再生医療学会(2012.6.12-14. 横浜)
- 中村陽子, 河合勝也, 森本尚樹, 田畑泰彦, 鈴木茂彦: bFGF とストロマ細胞由来因子の組み合わせ徐放化による皮弁生着率の検討. 第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会(2012.10.4-5. 福島)
- 中村陽子, 石川英史, 河合勝也, 田畑泰彦, 鈴木茂彦: SDF-1 遺伝子導入骨髓幹細胞を用いた創傷治癒促進能の検討. 第 42 回日本創傷治癒学会(2012.12.2-4. 北海道)
- 古谷洋之, 金子和夫, 田畑泰彦: 卵巣摘出マウスにおける bFGF 徐放化ゼラチンハイゲルゲルによる骨再生修復. 第 11 回日本再生医療学会(2012.3.1-2. 京都)
- 佐藤圭祐, 齊藤高志, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルからの難水溶性ピオグリタゾンの徐放とマクロファージ性質変化. 第 11 回日本再生医療学会総会(2012.6.12-14. 横浜)
- 佐藤圭祐, 齊藤高志, 田畑泰彦: 難水溶性ピオグリタゾンの徐放化ハイドロゲルの作製とマクロファージ性質変化. 第 28 回日本 DDS 学会(2012.7.4-5. 札幌)
- 佐藤圭祐, 齊藤高志, 田畑泰彦: 難水溶性低分子薬物ピオグリタゾンの体内徐放とマクロファージの性質変化. 第 7 回関西若手研究発表会(2012.8.2. 神戸)
- 佐藤圭祐, 田畑泰彦: ピオグリタゾン徐放化ハイドロゲルが体内マクロファージの極性変化に与える影響. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)
- 上田真澄, 田畑泰彦: 細胞への遺伝子導入に与える培養基材の影響. 第 11 回日本再生医療学会総会(2012.6.12-14. 横浜)
- 上田真澄, 田畑泰彦: 遺伝子の細胞内導入に対する細胞周辺環境の影響. 日本バイオマテリアル学会第 7 回関西若手研究発表会(2012.8.2. 神戸)
- 上田真澄, 田畑泰彦: 細胞への遺伝子導入に与えるレセプター刺激の影響. 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)

- 上田真澄, 田畑泰彦: スペルミン導入プルランによる幹細胞への遺伝子導入に対する外部刺激の影響. 2012KIPS 若手高分子シンポジウム (2012.12.7. 京都)
- 村上政広, 田畑泰彦: マクロファージ遊走活性因子を徐放するゼラチンハイドロゲルの作製. 第 11 回再生医療学会 (2012.6.12-14 横浜)
- 村上政広, 田畑泰彦: 難水溶性低分子薬物の徐放化によるマクロファージの遊走促進. DDS 学会 (2012.7.4-5. 札幌)
- 村上政広, 田畑泰彦: 炎症部位へのマクロファージ動員を指向したゼラチンハイドロゲルの作製. 第 7 回関西若手研究発表会 (2012.8.2. 神戸)
- 村上政広, 田畑泰彦: 難水溶性薬物の徐放化によるマクロファージの動員制御. 第 33 回日本バイオマテリアル学会 (2012.11.26-27. 仙台)
- 達富幹生, 上杉佳子, 田畑泰彦: 痛みの可視化のためのデキストラン誘導体造影剤の作製. 第 58 回高分子研究発表会 (2012.7.13. 神戸)
- 達富幹生, 上杉佳子, 田畑泰彦: 炎症を可視化する高分子造影剤の作製. 日本バイオマテリアル学会第 7 回関西若手研究発表会 (2012.8.2. 神戸)
- 達富幹生, 佐藤圭祐, 田畑泰彦: 炎症の可視化イメージングのためのシリカ粒子のデザイン. 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム (2012.11.26-27. 仙台)
- 内藤孝二郎, 佐藤圭祐, 田畑泰彦: キチン・キトサンフィルム上でのマクロファージの培養. 日本バイオマテリアル学会 第 7 回関西若手研究発表会 (2012.8.2. 神戸)
- 内藤孝二郎, 佐藤圭祐, 田畑泰彦: 種々の基材上でのマクロファージの性質変化. 日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2012 (2012.11.26-27. 仙台)
- 河合勝也, 川端慎吾, 尾崎千紗, 神田則和, 田畑泰彦, 鈴木茂彦: 新規医療材料シルクエラスチンの創傷治癒過程における作用機序の解明. 第 21 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2012.10.4-5. 福島)
- 上杉佳子, 永榮蓉子, 田畑泰彦: 糖結合性デキストラン誘導体を用いた PET 造影剤の開発. 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.28-31. 札幌)
- 上杉佳子, 永榮蓉子, 田畑泰彦: PET 造影のための糖結合性デキストラン誘導体の設計. 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6.12-14. 横浜)
- 上杉佳子, 南昌人, 富田佳紀, 湯浅聡, 矢野哲哉, 田畑泰彦: ゼラチン誘導体を用いた光音響イメージング造影剤の開発. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会 (2012.7.4-5. 札幌)
- Uesugi, Y., Kawata, H., Saito, Y., Tabata, Y.: Ultrasound-responsive thrombus treatment with zinc-stabilized gelatin nano-complexes of tissue-type plasminogen activator. T 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2012.7.15-18. Canada)
- Uesugi, Y., Morita, M., Jo, J., Minami, M., Tomita, Y., Yuasa, S., Yano, T., Tabata, Y.: Preparation of molecular probe for photoacoustic tomography diagnosis. 3rd TERMIS World Congress 2012 (2012.9.5-8. Austria)
- Uesugi, Y., Minami, M., Tomita, Y., Yuasa, S., Yano, T., Tabata, Y.: Molecular probe with gelatin derivative and indocyanine green complexes for photoacoustic tomography imaging. China-Japan Drug Delivery System Symposium 2012 (2012.11.13. Kyoto)
- 上杉佳子, 南昌人, 富田佳紀, 湯浅聡, 矢野哲哉, 田畑泰彦: ゼラチン誘導体を用いた光音響イメージングのための分子プローブの開発. 第 34 回日本バイオマテリアル学会大会 (2012.11.26-27. 仙台)

- 松井 誠, 古谷洋之, 田畑泰彦: 多血小板血漿徐放化ゼラチンハイドロゲルによる骨再生誘導. 第42回骨・カルシウム代謝研究会(2012.5.11. 京都)
- 松井誠, 古谷洋之, 田畑泰彦: 骨再生を誘導する多血小板血漿徐放化ゼラチンハイドロゲルの作製. 第11回日本再生医療学会総会(2012.6.12-14. 横浜)
- 松井 誠, 古谷洋之, 田畑泰彦: 多血小板血漿(PRP)と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の組み合わせ徐放による成熟血管新生効果: 大動物における前臨床試験. 第28回日本 DDS 学会(2012.7.4-5. 札幌)
- 松井 誠, 古谷洋之, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルを用いた多血小板血漿(PRP)と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の組み合わせ徐放による骨再生効果. 融合ナノ基盤研究会(2012.7.14. 京都)
- Matsui, M., Tabata, Y.: Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. Kyoto University Global COE "Center for Frontier Medicine" International Symposium / Retreat 2012(2012.10.5-6. Awaji)
- Matsui, M., Tabata, Y.: Enhanced angiogenesis by multiple release of platelet-rich plasma contents and basic fibroblast growth factor from gelatin hydrogels. China-Japan Drug Delivery System Symposium 2012(2012.11.13. Kyoto)
- 松井 誠, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルを用いたラパマイシン細胞内徐放システムの構築. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)
- 松井 誠, 古谷洋之, 田畑泰彦: 多血小板血漿徐放化ゼラチンハイドロゲルによる骨再生. 再生研学術講演会(2012.12.19. 京都)
- 松井 誠, 古谷洋之, 田畑泰彦: 骨再生を誘導する多血小板血漿徐放化ゼラチンハイドロゲルの作製. 第2回 DDS 徐放化再生医療研究会(2012.12.22. 京都)
- Tan, G. K., Tabata, Y.: Effect of gelatin microsphere size and cells/microspheres ratio on transforming growth factor-beta3-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. 3rd Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress(2012.9.5-8. Vienna, Austria)
- Tan, G. K., Tabata, Y.: Comparison of the effect of soluble chondroitin-4 and chondroitin-6 sulfate on human mesenchymal stem cell adhesion, proliferation and migration. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting(2012.6.13-16. Yokohama, Japan)
- 岡野将之, 田畑泰彦, 平野義明: 細胞集合体誘導ペプチドの合成と評価. 第58回高分子研究発表会(2012.7.13. 兵庫)
- 岡野将之, 田畑泰彦, 平野義明: 周期性ペプチドを用いた MSC 細胞集合体の作製. 日本バイオマテリアル学会 第7回関西若手研究発表会(2012.8.2. 兵庫)
- 鷺尾絢子, 寺下正道, 田畑泰彦, 北村知昭: FGF-2 による象牙芽細胞分化メカニズムの解析. 第10回日本再生歯科医学会学術大会(2012.9.1-2. 神戸)
- Ohno, K., Tsujii, Y., Tabata, Y.: Physiological properties of polymer brush-decorated fine particles prepared by surface-initiated living radical polymerization. 14th International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference(2012.5.13-18. Sendai)
- 城潤一郎, 林 雪, 中原鉄平, 青木伊知男, 佐賀恒夫, 田畑泰彦: 高分子造影剤を用いた血管新生治療の磁気共鳴イメージング. 第7回日本分子イメージング学会学術集会(2012.5.24-25. 浜松)
- Jo, J., Lin, X., Nakahara, T., Aoki, I., Saga, T., Tabata, Y.: Visualization of therapeutic angiogenesis with a polymer-



based magnetic resonance imaging contrast agent. 2010 World Molecular Imaging Congress(2012.9.5-8. Dublin)

山尾 健, 古川洋志, 齊藤 亮, 大澤昌之, 林 利彦, 田畑泰彦, 山本有平: メラノーマ治療成績向上を目指して～ヒアルロン酸修飾インターフェロン $\beta$ 徐放剤の開発－第1報－. 第21回日本形成外科学会基礎学術集会(2012.10.4-5. 福島)

岡 真也, 松本知之, 久保晴司, 松下雄彦, 佐々木宏, 西澤勇一郎, 松崎時夫, 齊藤高志, 西田康太郎, 田畑泰彦, 黒坂昌弘, 黒田良祐: simvastatin 局所徐放による前十字靱帯再建術後の移植腱－骨孔間の成熟促進効果について. 第11回日本再生医療学会(2012.6.12-14. 横浜)

岡 真也, 松本知之, 久保晴司, 松下雄彦, 佐々木宏, 西澤勇一郎, 松崎時夫, 齊藤高志, 西田康太郎, 田畑泰彦, 黒坂昌弘, 黒田良祐: simvastatin 局所徐放による前十字靱帯再建術後の移植腱－骨孔間の成熟促進効果について. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26-27. 名古屋)

松崎時夫, 松下雄彦, 松本知之, 岡 真也, 西澤勇一郎, 長井寛斗, 上藤淳郎, 齊藤高志, 田畑泰彦, 黒坂昌弘, 黒田良祐: マウス変形性関節症モデルに対する徐放化 rapamycin 投与による関節症進行抑制効果. 第2回 DDS 徐放化再生医療研究会(2012.12.22. 京都)

久田明子, 高橋亮介, 板橋直志, 山本治朗, 園田 浩, 齊藤 拓, 田畑泰彦: 微細加工表面を利用した細胞の3次元培養. 応用物理学会 2011 年度第5回ナノインプリント技術研究会(2012.2.24. 東京)

松峯 元, 佐々木亮, 田畑泰彦, 大和雅之, 河村俊治, 岡野光夫, 竹内正樹, 櫻井裕之: bFGF ドラッグデリバリーシステムによるラット顔面神経再生. 第39回日本マイクロサージャリー学会学術集会(2012.12.6-7. 福岡)

永井浩巳, 西山耕一郎, 清野由輩, 田畑泰彦, 岡本牧人: ラットの反回神経麻痺に対する bFGF を徐放させた自家筋膜移植の検討(自家筋膜の大きさと投与量). 第11回日本再生医療学会(2012.6.12-14. 横浜)

永井浩巳, 西山耕一郎, 清野由輩, 田畑泰彦, 岡本牧人: 一側性声帯麻痺に対する bFGF を徐放させた自家筋膜移植の検討－投与量と移植片の大きさについて－. 第64回日本気管食道科学会(2012.11.8-9. 東京)

星 嵩, 秋月達也, 松浦孝典, 今村亮祐, 小田 茂, 松井 誠, 田畑泰彦, 和泉雄一:  $\beta$ -TCP 含有ゼラチンハイドロゲルを用いた歯周組織再生・イヌ上顎根分岐部骨欠損における組織学的評価－a pilot study－. 第136回日本歯科保存学会春季学術大会(2012.6.28-29. 沖縄)

Sasaki, N., Tsuzuki, N., Nakao, S., Seo, J., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y.: Effect of biodegradable sponge composed of gelatin and b-tricalcium phosphate incorporating mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein-2 on an equine second or fourth metacarpal and/or metatarsal bone defect. 2012 American college of veterinary surgeons veterinary symposium(2012.11.1. USA)

Tsuzuki, N., Seo, J., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: The effect of bone morphogenetic protein-2, gelatin hydrogel microsphere incorporating platelet rich plasma, bone marrow derived mesenchymal stem cell and gelatin b-tri calcium phosphate sponge on an equine cartilage defect. 2012 American college of veterinary surgeons veterinary symposium(2012.11.1. USA)

Seo, J., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges. 2012 American college of veterinary surgeons veterinary symposium(2012.11.1. USA)

山家崇史, 都築 直, 徐 鐘筆, 田邊貴史, 内山裕貴, 上林義範, 羽田真悟, 古岡秀文, 山田一孝, 田畑泰彦, 佐々木直樹: 馬の近位指節関節固定術における LCP および生体組織工学の検討. 第25回日本ウマ科学会学術集

会(2012.12.3. 東京)

田邊貴史, 都築 直, 徐 鐘筆, 羽田真悟, 古岡秀文, 山田一孝, 田畑泰彦, 佐々木直樹: 馬の距骨外側滑車の関節軟骨欠損に対する生体組織工学を用いた2層法の影響. 第25回日本ウマ科学会学術集会(2012.12.3 東京)

都築 直, 徐 鐘筆, 大塚健史, 中尾奨吾, 大下のえ, 山田一孝, 羽田真悟, 古岡秀文, 田畑泰彦, 佐々木直樹: ウマの骨および関節軟骨に対する生体組織工学を用いた再生医療の応用. 第25回日本ウマ科学会学術集会(2012.12.3. 東京)

## 2) 講演・シンポジウム

Tabata, Y.: Tissue engineering technology indispensable for regeneration therapy and stem cell biology. BIDTE-2012(2012.1.6 Chennai) (招待講演)

田畑泰彦: DDS 技術の応用について. 京都大学医学研究科薬剤疫学分野(2012.1.11. 京都)

田畑泰彦: バイオマテリアル技術をベースとした再生医療. 岡山大学(2012.1.11. 岡山) (特別講演)

田畑泰彦: 生体機能性高分子 - からだを治すポリマー. 平成23年度 KIPS 高分子講座 2012(2012.1.18. 京都)

田畑泰彦: 再生治療と再生研究. 三洋化成(2012.1.20. 京都)

田畑泰彦: 再生医療のオーバービューとエレクトロ技術の必要性. パナソニック株式会社講演会(2012.1.23. 門真)

田畑泰彦: ものづくりのビジネスチャンスが広がる再生医療. 京都府ウエルネス産業人材育成セミナー(2012.1.25. 京都)

Tabata, Y.: Bone regeneration therapy based on tissue engineering. (2012.2.1. Jakarta)

Tabata, Y.: Applications of growth factor delivery technology to periodontal fields. (2012.2.2. Yogyakarta)

田畑泰彦: DDS 技術から見た再生医療. Meiji Seika ファルマ株式会社研究指導講演会(2012.2.7. 横浜)

田畑泰彦: 材料科学からみた再生医療 - 再生治療と再生研究 -. 電気化学株式会社講演会(2012.2.8. 東京)

田畑泰彦: 材料を用いた再生治療と再生研究. 東京応化工業株式会社講演会(2012.2.9. 東京)

田畑泰彦: バイオマテリアルからみた再生治療の今と未来. 平成23年度京都大学脳神経外科同門会(2012.2.11. 大阪)

田畑泰彦: DDS 技術をベースとした再生治療と再生研究. DS ファーマアニマルヘルス講演会(2012.2.20. 大阪)

田畑泰彦: バイオマテリアルの再生医療への応用. iPS アカデミアジャパン株式会社社内セミナー(2012.2.21. 京都)

田畑泰彦: 再生治療のためのイメージング技術. 医工学フォーラム-2011 年度特別学術講演会-(2012.2.22. 京都)

Tabata, Y.: Clinical experiences with drug delivery systems for regenerative medicine (Treatment of human diseases by DDS-Technology). The 2nd International Joint Symposium on Oral and Dental Sciences(2012.3.1. Yogyakarta) (招待講演)

田畑泰彦: もの作り技術から見た最先端医療-DDS 技術と遺伝子導入技術-. 花王講演会(2012.3.8 東京)

田畑泰彦: バイオマテリアルを用いた再生治療. 横浜市立大学講演会(2012.3.12 横浜)

Tabata, Y.: Research overview of drug delivery system and regenerative medicine therapy. 3B's Research Group. Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics. Dept. of Polymer Engineering, University of Minho(2012.3.14. Minho)

田畑泰彦: Biomaterial technologies indispensable for therapeutic angiogenesis. AP-VAS 2012(2012.3.29. 東京)

田畑泰彦: もの作り技術から見た最先端医療-再生治療と再生研究-. CKD 株式会社講演会(2012.4.4. 小牧)

- 田畑泰彦：「モノ作り」からみた再生医療のオーバービュー．KRP 平成 24 年度再生医療サポートビジネス懇話会（2012.4.20．京都）
- 田畑泰彦：材料科学からみた先端医療 ～再生治療と再生医学・生物学．第 1 回国際先端生物学・医学・工学会議（2012.4.21．名古屋）（基調講演）
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術が実現する再生治療．Clinician-Scientist 育成セミナー（2012.4.23．宇部）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルと再生治療．生体材料研究会（2012.4.28．京都）
- Tabata, Y.: Significance of biomaterials technology in regenerative medicine and therapy. Symposium on Frontier in Tissue Engineering, Scaffold, Drug Delivery Systems, Stem Cell Technology (2012.5.16. Alexandria)
- 田畑泰彦：再生医療を目指した細胞機能制御のための高分子材料デザイン．東レ第 2 回先端材料研究フォーラム（2012.5.21．大津）
- 田畑泰彦：再生医療における材料科学の重要性．日本ゴム協会年次大会（2012.5.24．京都）（特別講演）
- 田畑泰彦：再生研究と再生治療の現状とその将来展開．DS ファーマアニマルヘルス講演会（2012.5.25．大阪）
- Tabata, Y.: Frontier regeneration therapy based on tissue engineering. International Forum of Biomedical Materials: Nanobiomaterials for Tissue Regeneration (2012.5.30. Hangzhou)（招待講演）
- Tabata, Y.: Tissue engineering technology to realize angiogenic therapy. The 9th World Biomaterials Congress (2012.6.1-5. Chengdu)（招待講演）
- Tabata, Y.: Biomaterial design of cell scaffold for regenerative therapy and stem cell biology. The 9th World Biomaterials Congress (2012.6.1-5. Chengdu)（招待講演）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた先端医療．九州歯科大学講義（2012.6.8．北九州）
- 田畑泰彦：組織工学が拓く再生治療と再生研究の世界．第 11 回日本再生医療学会総会（2012.6.14．横浜）
- 田畑泰彦：自然治癒力を高めて病気を治す～再生医療の実際～．平成 24 年度芦屋川カレッジ（2012.6.20．芦屋）
- 田畑泰彦：生物医学・医療のための高分子材料．第 47 回高分子の基礎と応用講座（2012.6.22．大阪）
- 田畑泰彦：材料科学が支える先端医療と生物医学研究．東京大学大学院理学系研究科講演会（2012.6.25．東京）
- 田畑泰彦：自然治癒力からみた再生治療と再生医療の将来．2012 年度日本歯科保存学会春季学術大会（2012.6.29．沖縄）（特別講演）
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術をベースとした再生医療．九州大学歯学研究院講義（2012.7.11．福岡）
- 田畑泰彦：バイオマテリアル研究と学際研究．九州大学稲盛フロンティア研究センターセミナー（2012.7.12．福岡）
- 田畑泰彦：再生医療の最前線と今後の展望．同志社大学講義（2012.7.13．京田辺）
- 田畑泰彦：再生医療の現状と今後．第 39 回日本毒性学会学術年会（2012.7.17．仙台）
- 田畑泰彦：モノづくり技術を利用した再生医療－再生治療と再生研究－．第 39 回日本毒性学会学術年会（2012.7.17．仙台）
- 田畑泰彦：材料技術からみた先端医療と研究．日本電子株式会社講演会（2012.7.25．東京）
- Tabata, Y.: Clinical experiences with Drug Delivery Systems for regenerative medicine. Advances in Tissue Engineering 2012 (2012.8.10. Houston)（招待講演）
- 田畑泰彦：再生医療とは．ワンビシアーカイブズ講演会（2012.8.23．埼玉）
- Tabata, Y.: Significance of biomaterials in regenerative therapy and stem cell research. The 2nd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (2012.8.30. Taipei)（招待講演）
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療の現状と今後の展望－再生治療と再生研究－．第 10 回日本再生歯

科医学会学術大会・総会(2012.9.1. 神戸)

田畑泰彦：Tissue engineering technologies for growth factors promote tissue regeneration. 第4回国際創傷治癒学会(2012.9.4. 横浜)

Tabata, Y.: Biomaterials technology of regenerative medicine for patients. The 3rd TERMIS World Congress (2012.9.6. ウィーン)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療－再生治療と再生研究－. iPS細胞研究所 再生医療・臓器再建CM(2012.9.14. 京都)

Tabata, Y.: Biomaterial technologies for regenerative medicine and stem cell biology. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition(2012.9.18. Daegu) (招待講演)

田畑泰彦：モノづくり技術から見た再生医療ビジネス－再生治療と再生研究の違い－. －専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP Part V－(2012.9.26. 京都)

田畑泰彦：材料技術をベースとした再生治療と再生研究. Meiji Seika ファルマ株式会社講演会(2012.10.1. 小田原)

田畑泰彦：材料からみた再生医療. JNC 株式会社講演会(2012.10.2. 千葉)

田畑泰彦：バイオマテリアルを応用した循環器領域の再生治療. 第45回岐阜心臓研究会(2012.10.11. 岐阜) (特別講演)

Tabata, Y.: Controlled release of pioglitazone from biodegradable hydrogels to modify macrophage function. BMES 2012 Annual Meeting(2012.10.24-27. Atlanta)

田畑泰彦：再生医療に関する総論(成長因子, DDS, イメージングなど). －平成24年度再生医療分野の産業化を目指した実用セミナー－ 再生医療分野の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座(2012.10.29. 京都)

田畑泰彦：バイオマテリアルを用いた再生医療. 大阪大学歯学部講義(2012.10.31. 吹田)

田畑泰彦：医療機器と再生医療. 京都府立医科大学講義(2012.11.6. 京都)

Tabata, Y.: Drug Delivery Technology indispensable for regenerative medicine. BIT's 10th Anniversary of International Drug Discovery Science and Technology-2012(2012.11.10. Nanjing) (招待講演)

田畑泰彦：糖応答分解性ハイドロゲル粒子を用いた細胞凝集体の調製. 第70回日本化学繊維研究所講演会(2012.11.13. 京都)

田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生医療の現状と今後の展望－再生治療と再生研究－. 西宮歯科医師会(2012.11.17. 西宮)

田畑泰彦：バイオマテリアルを活用した循環器再生治療. 第56回北摂循環器研究会(2012.11.19. 吹田) (特別講演)

田畑泰彦：Signal 因子とドラッグデリバリー. 日本歯科大学講義(2012.11.20. 東京)

田畑泰彦：DDS 技術を活用した再生医療(再生治療と再生研究)の実用化. バイオマテリアル学会(2012.11.27. 仙台)

田畑泰彦：再生医療の全体像および細胞足場の開発における材料の組み合わせ方と利用方法. 技術情報協会「細胞足場」セミナー(2012.11.30. 東京)

田畑泰彦：バイオマテリアルを活用した循環器疾患の再生治療. 第21回大阪医科大学 Clinical Conference of Cardiology(2012.12.01. 大阪) (特別講演)

Tabata, Y.: Biomaterials technology indispensable for regenerative therapy and stem cell research. World Stem Cell Summit 2012(2012.12.4. Florida)

田畑泰彦：最先端医療と生物医学研究を支えるバイオマテリアル. 神戸大学大学院医学研究科整形外科講義

(2012.12.13. 神戸)

Tabata, Y.: Biomaterial and nano-material technology indispensable for regeneration therapy and stem cell research. Poly Tech 2012(2012.12.16. Pune) (招待講演)

Yamamoto, M.: Functional Hydrogel Biomaterials for modulation of stem cell behaviors. 日本薬剤学会国際委員会主催「2012年度第1回西地区英語セミナー」(2012.4.3. 京都) (招待講演)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Functional Hydrogel Biomaterials for modulation of stem cell behaviors. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体材料学セミナー(2012.7.11. 岡山)

山本雅哉, 田畑泰彦: 循環器再生医療を支える Tissue Engineering の最前線, 第16回 NMR マイクロイメージング研究会(2012.8.2. 大津) (招待講演)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Stimuli-responsive hydrogel scaffolds to control mesenchymal stem cell behaviors. ISOMRM 2012(2012.8.30. Taipei) (招待講演)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Stimuli-responsive hydrogel scaffolds to control mesenchymal stem cell behaviors. Biomedical Engineering Seminar, Northwestern University(2012.10.29. Chicago)

山本雅哉: 再生医療におけるハイドロゲルの役割, 京都リサーチパーク 平成24年度 再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座(2012.11.9. 京都) (招待講演)

黒田良祐, 松本知之, 岡 真也, 松崎時夫, 松下雄彦, 黒坂昌弘, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲルを用いた運動器再生の基礎研究, 第118回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会(2012.4.6-7. 大阪)

久田明子, 高橋亮介, 板橋直志, 山本治朗, 園田 浩, 齊藤 拓, 田畑泰彦: インプリント技術に応用した細胞の3次元培養, 応用物理学会月刊 OPTRONICS 特別セミナー【ナノインプリント技術とバイオ応用】セミナー(2012.3.14. 東京)



## 組織修復材料学分野 Department of Reporative Materials

分野主任 教授 岩田 博夫

Prof. Hiroo Iwata

### 【研究概要】

当研究分野では、病気や怪我の治療に役立つ人工材料を創り出すための研究を行っています。それらの材料は人体の中で機能したり、体外での細胞操作・分析に効力を発揮するなど、その目的と機能は様々です。当研究分野ではおもに、高分子を中心とする有機材料や、細胞や生体分子を制御・分析するための様々な技術を駆使することによって、それらの研究を進めています。このような研究を通じて、再生医療や低侵襲手術のような高度先進医療に貢献したいと考えています。

#### 材料-生体システム間相互作用の解析

体内に人工材料を埋込むと異物を排除しようと様々な生体反応が起こります。人工血管や人工心臓などを体内で長期間機能させるには、これらの生体反応を深く理解しコントロールする必要があります。当研究室では、様々な分析手法を用いて人工材料表面で生体反応が起こる仕組みを調べています。また、病気の判定基準となる血液中のバイオマーカーを高感度で検出できる装置を開発し、患者のそばですぐに結果を出せる検査システムの確立を目指しています(図1)。

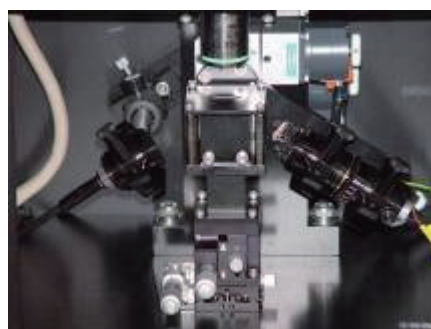


図1. 血液中のバイオマーカーを迅速・高感度計測するための装置。

#### 細胞表面修飾とその応用

細胞移植による臓臓や中枢神経の再生医療に大きな期待が寄せられています。しかし、移植された細胞の機能を高く維持するには、細胞がレシピエントの生体防御機構からの攻撃に打ち勝たなければなりません。これには両親媒性高分子からなる薄膜によって細胞を被覆する方法が有効であることを示してきました(図2)。また、細胞の表面修飾技術を応用すれば、細胞間の接着を引き起こすことが可能です。この技術を利用することで、ES細胞やiPS細胞の分化誘導について調べることができ、再生医療への新しい知見を得ることが期待できます。

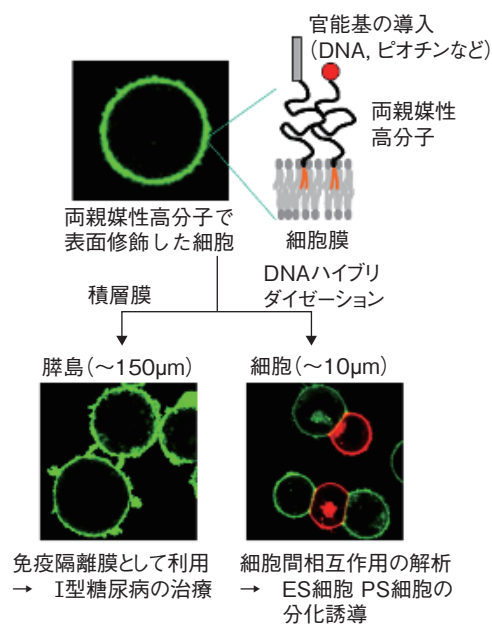


図2. 両親媒性高分子薄膜による細胞の被覆。

#### ES細胞/iPS細胞の凍結保存技術の確立

ES細胞やiPS細胞を利用した再生医療を確立するには、安定した細胞供給が必要になります。当研究分野では、細胞の生存率

を高く維持しながら凍結保存することに成功し、その技術の実用化に向けて研究を進めています。

### 血管内手術用具の開発

患者への負担の大きい外科的治療に対して、カテーテルを血管内に挿入して動脈瘤などを治療する方法(血管内治療)が注目されています。動脈瘤に詰め物をしてしまうコイル塞栓術と血管の正しい流れを確保するカバードステント留置術の二つの方法で(図3)、多様な形状をもつ動脈瘤の破裂を未然に防ぐデバイスを開発しています。これには、血液や血管表面と材料との相互作用や、材料の力学的・化学的性質を考慮したデバイス設計が求められます。

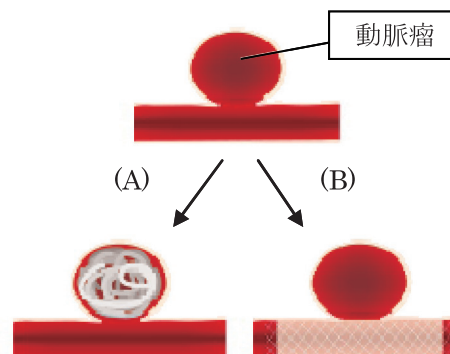
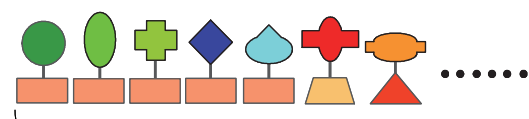


図3. (A)コイル塞栓術および(B)カバードステント留置術の模式図。

### 中枢神経の再生医療に向けた機能材料の設計

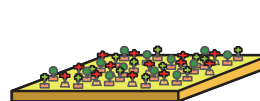
中枢神経疾患の一つであるパーキンソン病を、細胞移植によって治療する試みがなされています。しかし、そのような治療法を普及させるには、移植細胞源となる神経幹細胞の大量確保や、移植細胞の生着率向上を可能にする技術が確立されなくてはなりません。当研究分野では、大量の移植細胞を効率よく調製するための細胞培養デバイスの設計を行うとともに、移植細胞を保護するための蛋白質性材料の開発に取り組んでいます。これらの機能材料の構成要素には、合理的にデザインされた人工蛋白質が有用です(図4)。

細胞制御能と基材結合能をもつ種々のキメラ蛋白質を設計



目的とする機能に応じて適切なキメラ蛋白質を基材と複合化

細胞培養用デバイス  
(ガラス・合成高分子ベース)



移植細胞保護材料  
(生体高分子ベース)



図4. キメラ蛋白質を構成要素とするデバイスおよび機能材料の設計。

### 細胞チップ分析技術の確立

多種類の生体分子の機能を迅速に分析するための細胞チップの開発を行っています。アルカンチオール自己組織化単分子膜のマイクロパターンをもつ基板材料を利用して多種類のDNA, RNA, 蛋白質など配列固定し、それらを同時に細胞に作用させることで、固定された分子の生物学的機能を並列分析することが可能です(図5)。細胞チップ分析法は、生物学研究のみならず、再生医療、医薬品開発、臨床検査などの様々な分野に大きなインパクトを与えるものと期待しています。

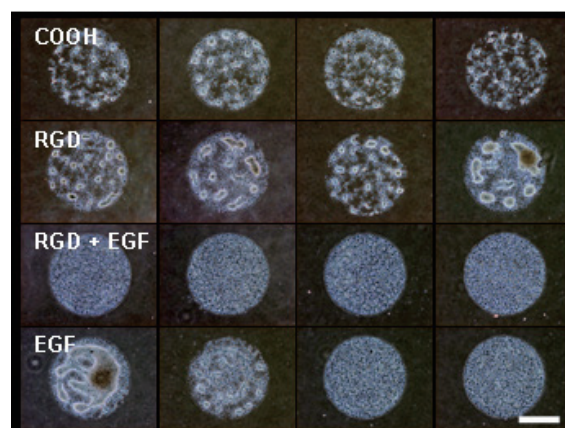


図5. 細胞チップによる蛋白質性材料のハイスループット機能アッセイの一例。

Our research group intends to develop engineered materials that contribute practically and efficiently to the advanced therapeutic interventions for the treatment of diseases and traumatic injuries. These materials are ex-

pected to exhibit diverse functions *in vitro* or *in vivo*. Fundamental and applied studies are undertaken to realize such biomaterials, taking advantage of organic materials, namely polymeric materials and state-of-the-art techniques for analyzing and handling biomolecules and cells.

Research subjects currently undertaken in our department are listed below.

#### **Surface chemistry of biomedical materials**

Protein adsorption, complement activation, cell adhesion are involved in the initial reactions against man-made materials with living bodies. It is necessary to elucidate these mechanisms in relation to the surface properties so as to rationally design biocompatible surfaces of synthetic implants. Most of information on the biological reactions against artificial polymeric materials has been accumulated from studies with polymeric materials. However, polymer surfaces could not be assumed rigid and immobile at equilibrium. The polymer molecules in the vicinity of the surface or interface would exhibit motion and relaxation in response to the different interfacial environments. Thus, it is difficult to prepare model surfaces using polymeric materials for studies of protein adsorption and cell adhesion. Self-assembled monolayers of alkanethiols formed on a gold thin film provide well-defined model surfaces suitable for studies on interfacial phenomena and intermolecular interactions. The surface plasmon resonance technique can be applied to analyze the interfacial phenomena under water. We have been studying protein adsorption, complement activation, and cell adhesion on well-defined surfaces made of self-assembled monolayers using the surface plasmon resonance technique as well other analysis techniques highly sensitive for interfacial molecular events.

#### **Polymeric materials for cell transplantation therapy**

Islets of Langerhans have been transplanted to treat insulin-dependent diabetes patients. Adult pancreatic  $\beta$  cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing  $\beta$  cells from cadaver donors or animals should be employed. In bioartificial pancreas, islets are encapsulated into a semi-permeable membrane and then implanted into the diabetic patients to protect them from immune rejection. The semi-permeable membrane permits permeation of oxygen and nutrient which are necessary for islet survival, but prohibits contact of islet cells with components of the host immune system. We encapsulated islets into agarose-based microbeads and induced normalization of blood glucose levels of diabetic recipient mice by implanting 1000 microencapsulated hamster islets into the peritoneal cavity.

Several research groups showed that transplantation of neural stem cells (NSCs) or NSC-derived progenitors to the site of lesions was effective for structural and functional restoration of the central nervous system. However, clinical applications of NSC further require methodological advances especially for controlling the engraftment, proliferation, migration, and differentiation of NSCs. Our approach is to construct composite biomaterials that consist of extracellular matrix (ECM) components and signaling molecules such as growth factors and cell adhesion molecules. We are employing genetic engineering to design rationally such composite biomaterials.

#### **Cell processing technology for regenerative medicine**

Cells and ECMs are important components for regenerative medicine. In recent years, many research groups have devoted enormous efforts to establish *in vitro* culture conditions in which stem cells, such as ES cells and

tissue-derived stem cells, differentiate into various functional cells. Those cells are expected to be very useful for treatment of various diseases. Many kinds of stromal cells have been used to differentiate stem cells to functional cells. However, most of stromal cells preferentially used are derived from mice. Some authorities who are in charge of regulatory issue have pointed out the difficulty to rule out the possibility that retrovirus incorporated in mouse gene will be activated and transferred to stem cells and functional cells derived from stem cells. One of our research activities is focused on the development of stromal cell free culture systems used for the induction of ES cells to various functional cells. ES cells cultured on the substrate, onto which bioactive molecules isolated from stromal cells, are immobilized effectively differentiated to dopaminergic neurons.

Conventional cell culture substrates are not always suitable for cells used for regenerative medicine. Neurons differentiated from ES cells in vitro are very difficult to be collected from a cell culture flask without deterioration of cell functions, because long axons from neurons are easily damaged during detachment of neural cells from the cell culture substrate. Cell sheets but not single cells are needed in some instance, such as regeneration of a skin and a mucous membrane. We have been examining a film of cellulose derivatives for a cell culture substrate. Cells cultured on it are removed by cellulose-degrading enzyme, cellulase, without damaging cells on the substrate.

#### **Cell chips for high-throughput functional screening**

Transfectional array : Functional characterization of human genes may be one of the most challengeable tasks in the post-genome era. Due to a huge number of novel genes discovered in genomics, high-throughput methods are required to express or silence in parallel thousands of genes in living cells. The objective of our study is to fabricate transfectional arrays through patterning of self-assembled monolayers on a gold substrate and the subsequent site-specific spotting of different expression vectors or short interfering RNAs.

Antibody array : Recent progress in stem cell research provides us with promising options of cell sources for use in tissue engineering. However, insufficient knowledge about specific surface antigens expressed on most of stem cells limits their application in regenerative medicine. To solve this problem, we developed a high-throughput analytical method for typing multiple membrane proteins. Our method is based on solid-phase cytometry using an antibody array prepared on a patterned alkanethiol monolayer.

ECM array : Arrays that display a panel of biologically-active substances on a flat plate are promising due to their potential use in functional screening over multiple samples in a parallel fashion. We developed cell-based arrays that displayed combinatorially various ECM-growth factor composites and used them for parallel and rapid screening biomaterials that serve to maintain NSCs and direct the differentiation of NSCs.

### **【業績目録】**

#### **◆ 誌上発表 ◆**

##### **1) 原著論文**

岩田博夫, 陳 顥, 出野 翔, 竹本直紘, 寺村裕治 : 生細胞への低分子薬剤の担持とその移植医療への応用. 日本化学繊維研究所講演集, **69**, 120-129(2012)

Takemoto, N., Teramura, Y., and Iwata, H. : Immobilization of sertoli cells on islets of langerhans. Biomater. Sci.,

(2013) in press

Murakami, T., Arima, Y., Toda, M., Takiguchi, H., Iwata, H.: Effect of dielectric spacer thickness on signal intensity of surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy. *Anal. Biochem.* **421**, 632-639 (2012)

Nakaji-Hirabayashi, T., Kato, K., Iwata, H.: Improvement of neural stem cell survival in collagen hydrogels by incorporating laminin-derived cell adhesive polypeptides. *Bioconj. Chem.* **23**, 212-221 (2012)

Ueda, Y., Fujita, S., Nishigaki, T., Arima, Y., Iwata, H.: Substrates for human pluripotent stem cell cultures in conditioned medium of mesenchymal stem cells. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **23**, 153-165 (2012)

Luan, N. M., Iwata, H.: Xenotransplantation of islets enclosed in agarose microcapsule carrying soluble complement receptor 1. *Biomaterials*, **33**(32), 8075-8081 (2012)

Kodama, T., Iwata, H.: Comparison of bare metal and statin-coated coils on rates of intra-aneurysmal tissue organization in a rat model of aneurysm. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* (in press)

Sakurai, K., Hoffecker, I.T., Iwata, H.: Long term culture of cells patterned on glass via membrane-tethered oligonucleotides. *Biomaterials*, **34**(2), 361-370 (2013)

## 2) 著 書

岩田博夫, 竹本直紘: 第3章 組織工学の新たな研究1 細胞の接着剤－望みの位置に細胞を貼り付ける－. 「再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み」(岩田博夫・松岡厚子・岸田晶夫監修, シーエムシー出版, 東京) (2012)

## 3) 総 説

中井隆介, 東 高志: 撮像法と画像解析法がもたらす情報－骨格筋画像解析によるトレーニング装具と再生医療の評価法－. *INNERVISION* **27**(3): 30-3 (2012)

岩田博夫, 竹本直紘: 膵内分泌機能の再生と人工材料. *G. I. Research*. **20**(4): 332-337 (2012).

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

岩田博夫: 細胞のレゴ, 私のエゴ, 組織のエゴ. 第41回医用高分子シンポジウム (2012.6.25-26. 東京)

北村成史, 岩田博夫: 表面修飾酸化鉄ナノ粒子を用いたランゲルハンス氏島の MR 画像化. 第61回高分子学会年次大会 (2012.5.29-31. 横浜)

北村成史, 岩田博夫: ランゲルハンス氏島の移植後 MRI 診断を指向した造影剤の開発. 第41回医用高分子シンポジウム (2012.6.25-26. 東京)

Kitamura, N., Nakai, R., Iwata, H.: Surface-labeling of pancreatic islets with ssDNA-modified magnetic nanoparticles for MR imaging. 6<sup>th</sup> International Symposium on Nanomedicine (2012. 11.29-12.1. Shimane)

北村成史, 中井隆介, 岩田博夫: ssDNA で表面修飾した磁性ナノ粒子の作製とランゲルハンス氏島の標識. 第141回ポータル会 (2012.12.1. 京都)

Kodama, T.: Comparison of bare metal and statin-coated coils on rates of intra-aneurysmal tissue organization in a rat model of aneurysm. Asian Pacific Stroke Conference 2012 (2012.9.10-12. Tokyo)



中井隆介, 東 高志, 児玉智信, 種村 浩, 浜田賢一, 鈴木秀謙, 滝 和郎, 岩田博夫: AuPt 合金を用いた磁化率アーチファクト低減コイルの開発と評価. 第 40 回日本磁気共鳴医学会大会(2012.9.6-8. 京都)

小長谷周平, 岩田博夫: ヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経のアガロースマイクロカプセル化. 第 7 回関西若手研究発表会 (2012.8.2. 神戸)

Konagaya, S., Kato, K., Komura, T., Iwata H.: Culture substrate for the expansion of neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells. 3rd TERMIS(Tissue Engineering and Regenerative Medicine) World Congress, (2012.9.5-8. Vienna)

Takemoto, N., Liu, X., Takii, K., Iwata, H.: Transplantation of co - aggregates of dissociated islet cells and Sertoli cells to treat type 1 diabetes in mice. 3rd TERMIS(Tissue Engineering and Regenerative Medicine) World Congress, (2012.9.5-8. Vienna)

Hoffecker, I.T., Sakurai, K., Iwata, H.: Cell on glass patterns using membrane tethered DNA. Kyoto institute of polymer science annual symposium(2012.12.7. Kyoto)

Hoffecker, I.T., Guo, W.H., Wang, Y.L., Iwata, H.: Pinch vs. pull: probing the resolution of cellular rigidity sensing. 5<sup>th</sup> International symposium on nanomedicine(2012.3.15-17. Nagoya)

板垣 亮, 有馬祐介, 岩田博夫: ポリエチレングリコール-脂質複合体を導入した平面脂質膜上での補体活性化挙動. 第 58 回高分子研究発表会(2012.7.13. 神戸)

出野 翔, 竹本直紘, 岩田博夫: 単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体を用いた抗酸化剤の血管内皮細胞への導入. 第 58 回高分子研究発表会(2012.7.13. 神戸)

## 2) 講演・シンポジウム

Iwata, H.: Cell surface modification with polymers for cell therapy. 2012 Annual Meeting of Formosa Association of Regenerative Medicine(2012.2.25. Taiwan)(招待講演)

岩田博夫: ありふれた技術からの革新的医療と革新的技術からのありふれた医療. 第 2 回医工薬産学公連携支援シンポジウム(2012.10.31. 京都)

児玉智信: 急性期脳梗塞治療のための血栓除去デバイスの開発. 大阪商工会議所 第 1 回次世代医療システム産業化フォーラム 2012(2012.6.27. 大阪)

児玉智信: 課題解決型医療機器 開発事例紹介. 新産業創造推進室 医療機器開発のための機能材料研究会第 3 回(2012.12.10. 京都)

## 生体物性学分野（国内客員） Department of Mechanical Properties

客員教授 佐藤 正明

Visiting Prof. Masaaki Sato

### 【研究概要】

力学的刺激を受けた細胞が形態的および機能的に応答する機構を解明すべく研究を行っている。血管内皮細胞は生体内において血液の流れによるせん断応力、血管壁の変形による引張・圧縮応力、血圧による静水圧を同時に受けて機能している。流れによるせん断応力および張力負荷については世界的にも良く研究されているが、未だ不明の点も多い。本主題に関し、張力負荷に対する内皮細胞の応答性について焦点接着斑の構成タンパク質の1つであるパキシリンが果たす役割に注目し、パキシリンをノックダウンした場合には張力に対して応答を示さないことを明らかにした。また、細胞核も力学応答に関与していることから細胞内アクチンフィラメントと核を連結するタンパク質であるネスプリンIの発現が重要であることを示してきた。本報告では、細胞内のメカノセンサ部位に力を伝達するのに重要な役割を果たしているストレスファイバーの収縮と座屈特性並びにヒト間葉系幹細胞にせん断応力を負荷した際の応答に関する我々の研究成果を紹介する。

この他、血管内留置用ステントの設計理論の開発、大動脈瘤の破裂機構の解明、歯科用医用材料の開発なども併せて行ってきた。

#### (1) ストレスファイバーの収縮と座屈特性

ストレスファイバーの座屈現象は、その要素成分であるアクチンフィラメントの分解と関係していることが示唆されている。しかしながら、座屈機構の詳細については未知である。その要因としては、ストレスファイバーの座屈現象の観察に当たって、細胞を弾性膜上で培養することによるイメージの不鮮明さと時間的分解能の問題が挙げられる。著者らは、観察が容易で鮮明な像が得られるガラス基板上でストレスファイバーを座屈させる方法論を採用した。ストレスファイバーを細胞から抽出し、光を照射することによって構成成分の一つであり収縮過程に関与するミオシンII分子を不活化した。Mg-ATPの添加によってアクチン-ミオシンの架橋サイクルが誘発され、かなりの割合で活性型ミオシンIIが残存している太いストレスファイバーのみに収縮が起こる(図1)。一方、細いストレスファイバーでは活性型のモータータンパク質の割合が少なく、収縮が起こる近傍ではファイバーの短縮によって必然的に同時に座屈が生じることになる(図1)。この独創的な優れた技法を使ってストレスファイバーの収縮と座屈を選択的に起こし、細胞内におけるストレスファイバーに内在する力を計測することによってストレスファイバーの分解機構や個々のストレスファイバーの相対的な太さの計測が可能になることが示された。

#### (2) せん断応力下におけるヒト間葉系幹細胞の遊走現象

ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)は、細胞による組織修復に利用可能であり、かつ組織傷害部位に治療のための遺伝子を運搬するためのベクターとしても利用されてきている。hMSCsは移植後血液や間質液の流れによるせん断応力を感知して応答する可能性があることが指摘されてきた。しかしながら、せん断応力下におけるhMSCsの遊走やその機構に関してはほとんど研究がない。著者らは、hMSCsの遊走に対するせん断応力の影響と分裂促進因子

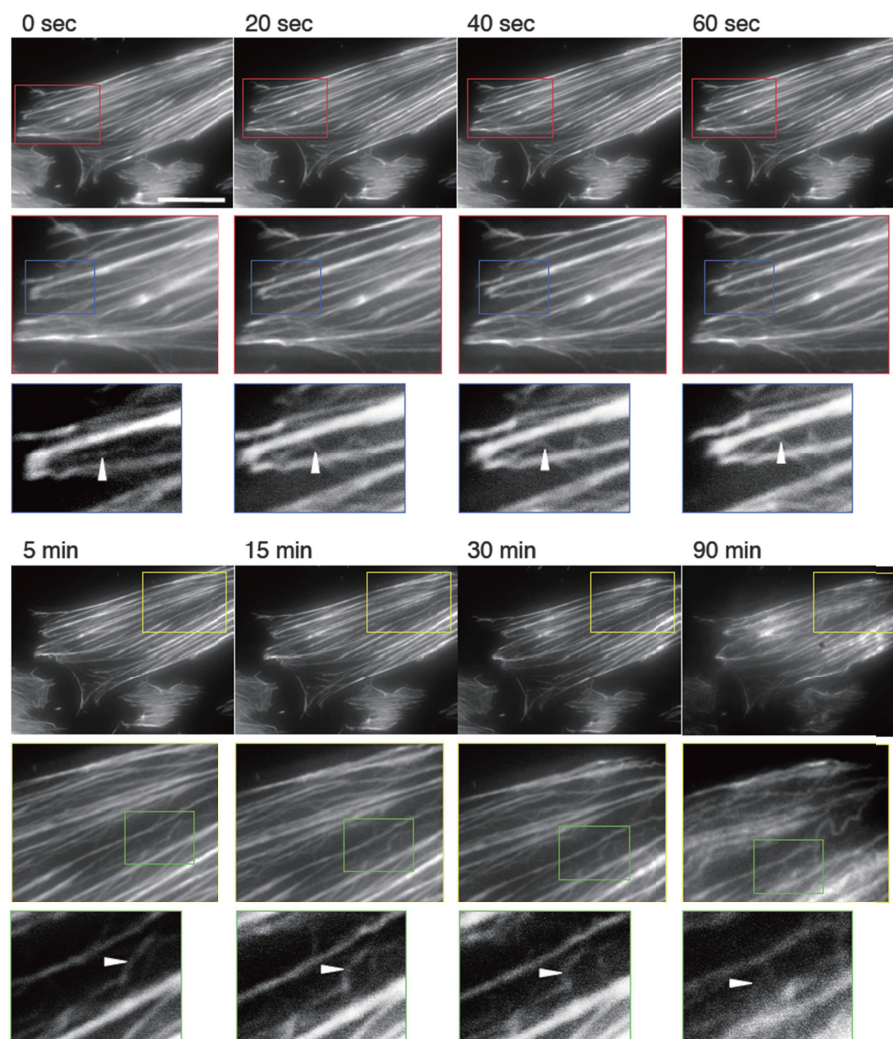


図 1. ストレスファイバーに同時に観察される収縮と座屈現象. 抽出したストレスファイバーには予め水銀ランプの光を照射し、その後 Mg-ATP を添加した. Mg-ATP に反応して収縮するストレスファイバーと収縮のみられないストレスファイバーが存在する. 囲み部分を拡大した写真の矢頭は細胞全体を収縮させたときにストレスファイバーが座屈した箇所を示している.

Fig. 1 Simultaneous contraction and buckling of SFs. Extracted SFs were pre-illuminated by a mercury lamp and then stimulated with Mg-ATP. Some SFs responded to Mg-ATP to contract, while other fibers (indicated by arrowheads in the higher-magnification images of the boxed areas) exhibited buckling as the whole cell shortened.

活性化タンパク質キナーゼ(MAPKs)の役割について検討した. 実験において, 蛍光色素でラベルした hMSCs に 0.2~10Pa のせん断応力を負荷した. 細胞の遊走は, 細胞の創傷治癒アッセイ法に基づいて評価し, その様子は 3 CCD デジタルカメラを装備した光学顕微鏡を用いて撮影した. 実験結果を図 2 に示す. 0.2Pa のせん断応力下で培養した hMSCs は静的培養状態(コントロール)の場合に比べ遊走速度が優位に速かった. これに対し, 0.5 および 1Pa のせん断応力の下ではコントロールに比べて有意な変化はみられなかった. また, 2Pa 以上のせん断応力では, hMSCs の遊走は著しく抑制された. 0.2Pa のせん断応力を受けた hSMCs では, 細胞内シグナル伝達物質である ERK1/2, JNK, p38MAPK の活性上昇が約 60 分の間観察された. しかしながら, 2Pa のせん断応力を負荷した細胞では, これらの活性は生じなかった. JNK と p38MAPK の阻害剤で細胞を処理したところ, hMSCs の遊走現象に対するせん断応力の影響は完全に抑制された. 一方, ERK1/2 阻害剤で処理したコントロール状態の細胞とせん断応力負荷細胞では有意な差がみられた. 以上の点から, 低いせん断応力による力学刺激は hMSCs の遊走を効果的に促進し, せん断応力によって誘導される遊走現象に対して, JNK と p38MAPK は ERK1/2 よりもより

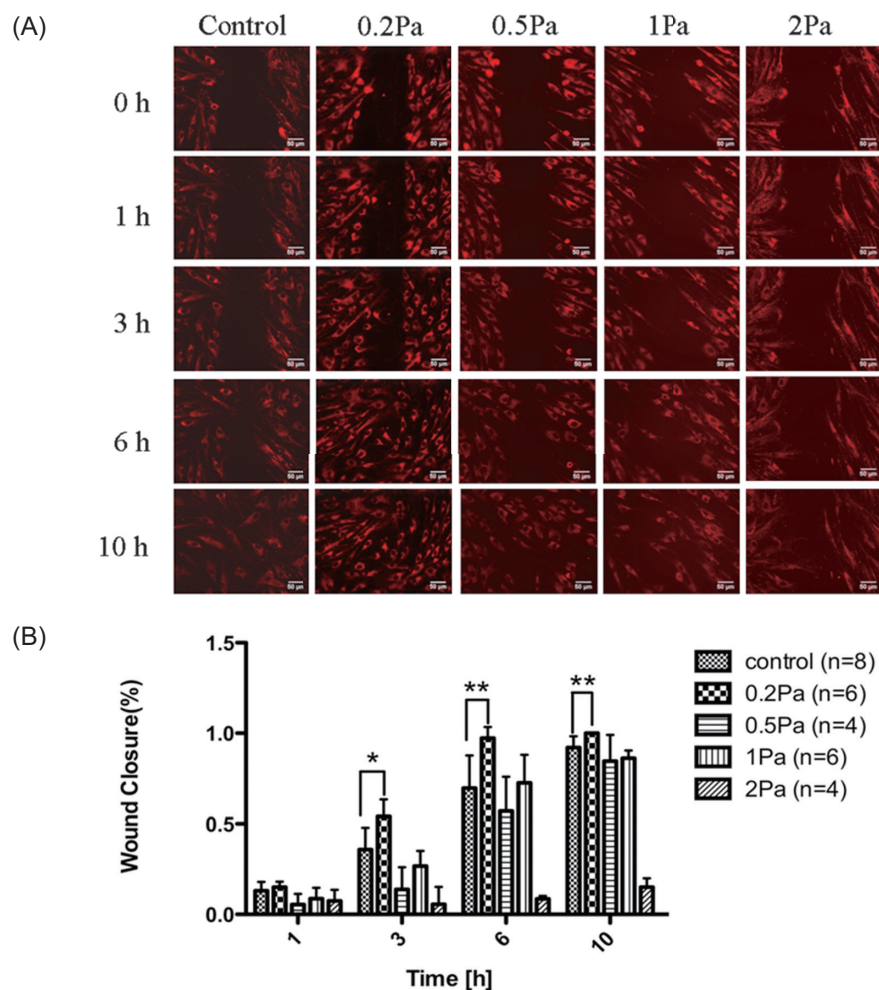


図 2. ヒト間葉系幹細胞(hMSCs)の遊走に対するせん断応力の影響. (A)創傷治癒アッセイ法によるコントロール状態及び4種類の異なるせん断応力下におけるhMSCsの遊走状態の時間経過. バー=50  $\mu\text{m}$ . (B)コントロール状態及び4種類の異なるせん断応力下における創傷部位の修復状態の割合. 0.2Paでは早期に修復がみられるのに対し, 2Pa以上のせん断応力では細胞の遊走が抑制されていた. データは平均値±標準偏差で表示. \*P<0.05, \*\*P<0.01

Fig. 2 Effects of shear stress on hMSC migration. (A) Fluorescence image of hMSC migration in the scratch wound assay under different shear stress conditions. Bars = 50  $\mu\text{m}$ . (B) Percentages of wound closure under 0.2, 0.5, 1, and 2 Pa shear stress conditions. Wound closure was promoted under a shear stress of 0.2 Pa, whereas shear stress > 2 Pa inhibited cell migration. Data are expressed as mean $\pm$ SD, \*P<0.05, \*\*P<0.01.

有効に寄与していることが推察された.

Studies in our laboratory have been carried out to elucidate the mechanosensing mechanisms of morphological and functional changes of cells exposed to mechanical forces. Vascular endothelial cells located at the innermost layer of vessel wall are always exposed to shear stress by blood flow, to tensile/compressive stress by vessel deformation and to hydrostatic pressure by blood pressure. Although endothelial cells have been well investigated from the point of view of mechanobiology by many researchers, the details of the mechanisms are not clear yet. In order to understand the role of paxillin in the orientation of endothelial cells exposed to cyclic stretching, we examined the time course of changes in the shape and distribution of focal adhesion proteins of paxillin knockdown endothelial cells. We also investigated nuclear deformation behavior in nesprin-1 knocked-down endothelial cells subjected to uniaxial stretching by evaluating nuclear strain from lateral cross-sectional images from the point of view of cel-



lular nuclear importance on mechanical response to external forces. In this report, I mainly introduce our recent results on contraction and buckling properties of stress fibers, one of the mechanosensing components, and migration of human mesenchymal stem cells under shear stress.

In addition, we have developed the design theory for intravascular stent, and analyzed the rupture mechanism of aortic aneurysm and the development of dental-use biomaterials from the point of view of biomechanics.

### **(1) Contraction and Buckling Properties of Stress Fibers**

It has been proposed that buckling of actin stress fibers (SFs) may be associated with their disassembly. However, much of the detail remains unknown partly because the use of an elastic membrane sheet, conventionally necessary for inducing SF buckling with a mechanical compression to adherent cells, may limit high quality and quick imaging of the dynamic cellular events. Here, we present an alternate approach to induce buckling behavior of SFs on a readily observable glass plate. Actin SFs were extracted from cells, and constituent myosin II (MII) molecules were partially photo-inactivated in contractility. An addition of Mg-ATP allowed actin-myosin cross-bridge cycling and resultant contraction of only thick SFs that still contained active MII in the large volume (Fig. 1). Meanwhile, thin SFs with virtually no active motor protein in the small volume had no choice but to buckle with the shortening movement of nearby thick SFs functioning as a compression inducing element (Fig. 1). This novel technique, thus allowing for selective inductions of contraction and buckling of SFs and measurements of the cellular prestress, may be applicable to not only investigations on their disassembly mechanisms but also to measurements of the relative thickness of individual SFs in each cell.

### **(2) Migration of Human Mesenchymal Stem Cells under Shear Stress**

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are attractive candidates for cell-based tissue repair approaches and have been used as vectors for delivering therapeutic genes to sites of injury. It is believed that hMSCs are able to detect and respond to shear stress due to blood and interstitial fluid flow through mechanotransduction pathways after transplantation. However, information regarding hMSC migration under shear stress and its mechanism is still limited. We examined the effect of shear stress on hMSC migration and the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in their migration. Shear stress between 0.2 and 10 Pa, which was produced by the flow medium, was exerted on fluorescently labeled hMSCs. Cell migration was evaluated using the scratch wound assay, and images were captured using a microscope equipped with a digital 3CCD camera. The results showed that hMSCs subjected to a shear stress of 0.2 Pa caused notably faster wound closure than statically cultured hMSCs, while migration in the 0.5- and 1-Pa shear stress group did not differ significantly from that in the control group (Fig. 2). Shear stress > 2 Pa markedly inhibited hMSC migration. hMSCs subjected to a shear stress of 0.2 Pa displayed an increase in extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), c-Jun Nterminal kinases (JNK), and p38 MAPK activation for up to 60 min, while a shear stress of 2 Pa abrogated the activation. JNK and p38 MAPK inhibitors completely abolished the effect of shear stress on hMSC migration, while significant differences were observed between the ERK1/2 inhibitor-treated static control and shear stress groups. Taken together, these results demonstrate that low shear stress effectively induces hMSC migration and that JNK and p38 MAPK play more prominent roles in shear stress-induced migration than ERK1/2.



## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- S. Deguchi, T. S. Matsui and M. Sato : Simultaneous contraction and buckling of stress fibers in individual cells. *J. Cell. Biochem.* **113**, 824-832 (2012)
- S. Sugita, T. Matsumoto, T. Ohashi, K. Kumagai, H. Akimoto, K. Tabayashi and M. Sato : Evaluation of rupture properties of thoracic aortic aneurysms in a pressure-imposed test for rupture risk estimation. *Cardiovasc. Eng. Tech.* **3**(1), 41-51 (2012)
- W.-J. Huang, N. Sakamoto, R. Miyazawa and M. Sato : Role of paxillin in the early phase of orientation of the vascular endothelial cells exposed to cyclic stretching. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **418**(4), 708-713 (2012)
- 杉田修啓, 松本健郎, 大橋俊朗, 熊谷紀一郎, 秋元弘治, 田林暁一, 佐藤正明 : 胸部大動脈瘤の拍動特性から破裂圧力が推定できるか? *脈管学* **52**, 277-283 (2012)
- T. Anno, N. Sakamoto and M. Sato : Role of nesprin-1 in nuclear deformation in endothelial cells under static and uniaxial stretching conditions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **424**, 94-99 (2012)
- L. Yuan, N. Sakamoto, G.-B. Song and M. Sato : Migration of human mesenchymal stem cells under low shear stress mediated by MAPK signaling. *Stem Cells Develop.* **21**(13), 2520-2530 (2012)
- Y. Kuboki, T. Furusawa, M. Sato, S. Yongkun, H. Unuma, R. Fujisawa, S. Abe, T. Akasaka, F. Watari, H. Takita and R. Sammons : Casein, phosvitin and dentin phosphoprotein (phosphophoryn) were shown to bind titanium surface by using chromatography column that was packed with titanium beads. *Bio-Med. Mater. Eng.* **22**, 283-288 (2012)
- M. Sato, S. Kawamoto, M. Watanabe, N. Sakamoto, M. Sato, Y. Tabata and Y. Saiki : Medial regeneration using a biodegradable felt as a scaffold preserves integrity and compliance of a canine dissected aorta. *Circulation* **126**, S102-109 (2012)
- S. Deguchi, T. S. Matsui, D. Komatsu and M. Sato : Contraction of stress fibers extracted from smooth muscle cells : Effects of changing the ionic strength and temperature. *J. Biomech. Sci. Tech.* **7**(4), 388-398 (2012)
- T. Minatoya, T. Furusawa, M. Sato, Y. Matsushima and H. Unuma : Bioactive glass cloth that promotes new bone formation. *Key Eng. Mat.* **529-530**, 266-269 (2013)
- J.B. Kim, T. Okudera, T. Furusawa, M. Sato, W. Yan, Y. Matsushima, H. Unuma, and T. Sasano : In vivo and in vitro biological efficacy of double-layer coating of titanium with gelatin and calcium phosphate. *J. Ceram. Soc. Jap.* **120**(12), 589-593 (2012)
- T. Hatta, H. Sano, N. Sakamoto, K. N. Kishimoto, M. Sato and E. Itoi : Nicotine reduced MMP-9 expression in the primary porcine tenocytes exposed to cyclic stretch. *J. Orthop. Res.* (in press).

#### 2) 総説・著書

- T. Ohashi and M. Sato : Chapter 22 : Endothelial cell responses to fluid shear stress : From Methodology to Applications, in "Single and Two-Phase Flows on Chemical and Biomedical Engineering", Bentham Science Publishers, Editors : R. Dias, A. A. Martins, R. Lima, T. M. Mata, pp.579-599, 2012.

D. Yoshino and M. Sato : Chap. 8 Design and evaluation of self-expanding stents suitable for diverse clinical manifestation based on mechanical engineering. in “Mechanical Engineering” ed. by M. Gokcek, e-Book, InTech, pp. 181-208, 2012.

佐藤正明, 出口真次, 安達泰治, 村上輝夫, 廣川俊二 : 「バイオメカニクス最前線」 共立出版, 2013

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

Deguchi, S., Matsui, S.T., Kaunas, R., Sato, M. : Role of stress fibers in cellular tensional homeostasis. The 2nd BMES-SPRBM Conference on Cellular and Molecular Bioengineering (2012.1.3-7. Puerto Rico)

吉野大輔, 井上絵里, 坂元尚哉, 佐藤正明 : 一様せん断応力勾配下における血管内皮細胞の形態的応答. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

小俣誠二, 坂元尚哉, 佐藤正明 : 静水圧を受けた内皮細胞の3次元形態観察. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

坂元尚哉, 韓 笑波, 大谷祥一郎, 佐藤正明 : MAP キナーゼを介した空間的せん断応力勾配に対する内皮細胞の形態応答. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

仁井田優作, 前田英次郎, 佐藤正明, 大橋俊朗 : 流れせん断応力負荷内皮細胞の形態変化過程における牽引力計測. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

村田勝章, 須長純子, 佐藤正明, 安達泰治 : 骨細胞突起のメカノセンシング特性. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

松井 翼, 出口真次, 佐藤正明 : 細胞内張力伝達要素ストレスファイバの形成・維持の分子メカニズム. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

村田勝章, 須長純子, 佐藤正明, 安達泰治 : 骨細胞突起のメカノセンシング特性. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

仁井田優作, 前田英次郎, 佐藤正明, 大橋俊朗 : 流れせん断応力負荷内皮細胞の形態変化過程における牽引力計測. 第24回バイオエンジニアリング講演会 (2012.1.7-8. 大阪)

Takahashi, K., Ozawa, H., Sakamoto, N., Minegishi, Y., Sato, M., Itoi, E. : Influence of the intramedullary stress distribution on pathogenesis of cervical spondylotic myelopathy : Biomechanical study using a finite element method. Orthopaedic Research Society Annual Meeting (2012.2.4-7. San Francisco)

Huang, W-J., Sakamoto, N., Hanamura, K., Miyazawa, R., Sato, M. : Involvement of intercellular junction proteins in the redistribution of focal adhesions and orientation of vascular endothelial cells exposed to cyclic stretch. The 18th International Symposium of Tohoku University Global COE Programme (2012.3.5-6. Sendai)

Sato, M. : Mechanical states in living endothelial cells exposed to fluid shear stress. The 18th International Symposium of Tohoku University Global COE Programme (2012.3.5-6. Sendai)

Huang, W-J., Sakamoto, N., Miyazawa, R., Sato, M., Role of paxillin in the morphological changes and redistribution of focal adhesions in endothelial cells exposed cyclic stretch. The 18th International Symposium of Tohoku University Global COE Programme (2012.3.5-6. Sendai)

Ito, K., Sato, M. : Distribution of traction force in smooth muscle response to myosin light chain phosphorylation.

- The 18th International Symposium of Tohoku University Global COE Programme (2012.3.5-6. Sendai)
- Oya, K., Sakamoto, N., Sato, M.: ERK affects assemble of actin filaments in macrophases under cyclic stretch and hypoxic condition. The 18th International Symposium of Tohoku University Global COE Programme (2012.3.5-6. Sendai)
- Matsui, T.S., Deguchi, S., Sato, M. Micro-tensile tester for probing biomechanical properties of isolated cytoskeletal bundles. The 18th International Symposium of Tohoku University Global COE Programme (2012.3.5-6. Sendai)
- 齋藤 明, 出口真次, 松井翼, 佐藤正明: 平滑筋細胞と繊維芽細胞の配向制御法について. 日本機械学会東北支部第47期総会・講演会 (2012.3.13. 仙台)
- 宇田侑平, Poh, Y-C., Chowdhury, F., Wu, D. C., Tanaka, T. S., 佐藤正明, Wang, N.: 異なるリガンドを介して負荷した力学刺激に対する胚肝細胞の分化応答に関する研究. 日本機械学会東北支部第47期総会・講演会 (2012.3.13. 仙台)
- 杉田修啓, 松本健郎, 大橋俊朗, 熊谷紀一郎, 秋元弘治, 田林暁一, 佐藤正明: 大動力瘤壁の力学特性と引張強さの関連-破裂を予測する指標の構築を目指して-. 日本機械学会東海支部第61期総会・講演会 (2012.3.15-16. 名古屋)
- Ohashi, T., Niida, Y., Sato, M.: Dynamics of traction forces of endothelial cells under fluid shear stress by using micropillar substrate. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Adachi, T., Murata, M., Sunaga, J., Sato, M.: Characteristics of nitric oxide production in mechanically stimulated osteocytes. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Ohashi, K., Abiko, H., Hiattari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K.: Identification of Rho-GEFs involved in cyclic stretch-induced alignment of vascular endothelial cells. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Sato, M.: Force transmission and strain distribution in endothelial cells exposed to shear stress. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Sakamoto, N., Han, X-B., Yoshino, D., Sato, M.: Morphological response of vascular endothelial cells to spatial gradient of fluid shear stress. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Huang, W-J., Sakamoto, N., Miyazawa, R., Sato, M.: Paxillin-dependent focal adhesion accumulation is involved in cyclic stretch-induced orientation changes of endothelial cells. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Murata, M., Sunaga, J., Sato, M., Adachi, T.: Characteristics of nitric oxide production in mechanically stimulated osteocytes. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Oya, K., Sakamoto, N., Sato, M.: Combined stimulation with cyclic stretch and hypoxia affects morphology of macrophages. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Matsui, T. S., Onodera, H., Minegishi, Y., Sato, M., Deguchi, S.: Biophysical properties of actin stress fibers. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Abiko, H., Hiattari, R., Ohashi, K., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K.: Analysis of the role of Rho-Gefs in mechanotransduction of vascular endothelial cells. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)

- Yuan, L., Sakamoto, N., Song, G-B., Sato, M. : Low shear stress via MAPK signaling stimulates migration of human mesenchymal stem cells. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Yoshino, D., Inoue, E., Sakamoto, N., Sato, M. : Combined effect of fluid shear stress and its spatial gradient on morphological changes in endothelial cells. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Inoue, E., Yoshino, D., Sakamoto, N., Kanzaki, M., Sato, M. : Analyzing endothelial cell gene expression in response to magnitude of spatial gradient in fluid shear stress. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Kitatani, K., Satou, K., Abe, S., Ohashi, K., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K. : Regulation of ECM rigidity-induced transformation by Rho-GEF in mammary epithelial cells. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- 古澤利武, 佐藤正明, 奥寺俊允, 門間康祐, 松嶋雄太, 鷗沼英郎 : ゼラチンとリン酸カルシウムをコートしたチタンの in vivo および in vivo 評価. 日本セラミック協会 2012 年年会 (2012.3.19-21. 京都)
- 齋藤 明, 出口真次, 松井 翼, 佐藤正明 : 2 次元培養した細胞を任意方向に配列させる方法. 第 51 回日本生体医工学会大会 (2012.5.10-12. 福岡)
- Sugita, S., Matsumoto, T., Ohashi, T., Kumagai, K., Akimoto, H., Tabayashi, K., Sato, M. : Biomechanical evaluation of mechanical properties of thoracic aortic aneurysms toward rupture risk estimation. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering (2012.5.26-31. Beijing, China)
- Ohashi, K., Abiko, H., Hiattari, R., Sakamoto, N., Sato, M., Mizuno, K. : Identification of Rho-GEFs involved in mechanosensing of vascular endothelial cells. 第 64 回日本細胞生物学会大会 (2012.5.28-31. 神戸)
- 出口真次, 松井 翼, 小松大貴, 佐藤正明 : STRESS FIBER と筋肉の収縮特性の違いについて. 第 35 回日本バイオレオロジー学会年会 (2012.5.31-6.2. 新潟)
- Ohashi, T., Niida, Y., Tanaka, R., Sato, M. : Simultaneous measurement of morphology and traction forces of endothelial cells under fluid shear stress. ASME 2012 Summer Bioengineering Conference (2012.6.20-23. Puerto Rico, USA)
- Yuan, L., Sakamoto, N., Song, G-B., Sato, M. : Migration of human mesenchymal stem cells is stimulated by low shear stress via MAPK signaling. ASME 2012 Summer Bioengineering Conference (2012.6.20-23. Puerto Rico, USA)
- Niida, Y., Maeda, E., Sato, M., Ohashi, T. : Analysis of traction forces from endothelial cells during remodeling to fluid flow. European Society of Biomechanics (2012.7.1-4. Lisbon, Portugal)
- Deguchi, S., Saito, A.C., Matsui, T.S., Sato, M. : Controlling the orientation of adherent cells in arbitrary directions. The 14th International Congress of Biorheology and the 7th International Conference on Clinical Hemorheology (2012.7.4-7. Istanbul, Turkey)
- Sato, M., Anno, T., Sakamoto, N. : Nucleus deformation of endothelial cell exposed to stretch and the role of LINC complex. The 14th International Congress of Biorheology and the 7th International Conference on Clinical Hemorheology (2012.7.4-7. Istanbul, Turkey)
- Adachi, T., Murata, M., Sunaga, J., Sato, M. : Nitric oxide production induced by local mechanical stimulus in isolated osteocytes. The 14th International Congress of Biorheology and the 7th International Conference on

Clinical Hemorheology (2012.7.4-7. Istanbul, Turkey)

Yoshino, D., Sakamoto, N., Takahashi, K., Inoue, E., Sato, M.: Changes in cytoskeletal structures and focal adhesion of vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress with its spatial gradient. The 14th International Congress of Biorheology and the 7th International Conference on Clinical Hemorheology (2012.7.4-7. Istanbul, Turkey)

齋藤 明, 出口真次, 松井 翼, 佐藤正明: 微小溝上に培養した細胞の接着と配向について. 日本機械学会年次大会 (2012.9.9-12. 金沢)

仁井田優作, 佐藤正明, 大橋俊朗: 流れ負荷血管内皮細胞の牽引力ダイナミクス. 日本機械学会年次大会 (2012.9.9-12. 金沢)

黄文敬, 坂元尚哉, 宮澤遼太郎, 佐藤正明: 繰り返し伸展負荷内皮細胞の配向における焦点接着斑の凝集に果たす paxillin の役割. 日本機械学会年次大会 (2012.9.9-12. 金沢)

Ohashi, T., Niida, Y., Sato, M.: Traction force measurement of sheared endothelial cells by using micropillar substrate. The 9th International Conference on Flow Dynamics (2012.9.19-21. Sendai)

Han, X-B., Sakamoto, N., Tomita, N., Hui, M., Sato, M., Ohta, M.: Relationship between fluid shear stress and the phenotype change of smooth muscle cells in a co-culture model. The 9th International Conference on Flow Dynamics (2012.9.19-21. Sendai)

Ohashi, T., Niida, Y., Sato, M.: Traction force measurement of sheared endothelial cells by using micropillar substrate. The 9th International Conference on Flow Dynamics (2012.9.19-21. Sendai)

Matsui, T.S., Komatsu, D., Sato, M., Deguchi, S.: Measurement of contractile properties of stress fibers isolated from vascular smooth muscle cells. 第 50 回日本生物物理学会年会 (2012.9.22-24. 名古屋)

Deguchi, S., Matsui, T.S., Komatsu, D., Sato, M.: Contractile properties of stress fibers are distinct from those of muscles. 第 50 回日本生物物理学会年会 (2012.9.22-24. 名古屋)

齋藤 明, 出口真次, 松井 翼, 佐藤正明: 細胞焦点接着斑の成熟と力の関係について. 第 23 回バイオフロンティア講演会 (2012.10.5-6. 弘前)

仁井田優作, 佐藤正明, 大橋俊朗: マイクロピラーデバイスを用いた流れ負荷内皮細胞の牽引力計測. 第 23 回バイオフロンティア講演会 (2012.10.5-6. 弘前)

Minatoya, T., Furusawa, T., Sato, M., Unuma, H.: Bioactive glass cloth that promotes new bone formation. Bioceramics-24 (2012.10.21-24. Fukuoka)

Sakamoto, N., Anno, T., Sato, M.: Mechanical role of nesprin-1 in nuclear shape in vascular endothelial cells subjected to stretching. 2012 Ann. Meeting Biomed. Eng. Soc. (2012.10.24-27. Atlanta, USA)

Sato, M., Yoshino, D., Sakamoto, N., Inoue, E.: Morphological changes of endothelial cells under combined condition of fluid shear stress and its spatial gradient. 2012 Ann. Meeting Biomed. Eng. Soc. (2012.10.24-27. Atlanta, USA)

古澤利武, 佐藤正明, 奥寺俊允, 久保木芳徳: チタンウェブインプラントの骨伝導能効果. 第 32 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会 (2012.11.3-4. 郡山)

古澤利武, 佐藤正明, 鵜沼英郎: 可溶性リン酸カルシウムコートインプラントの MC3T3-E1 細胞への影響. 第 32 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会 (2012.11.3-4. 郡山)

古澤利武, 佐藤正明, 奥寺俊允, 鵜沼英郎: 可溶性リン酸カルシウムコートインプラントの骨親和性について. 第



32 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会(2012.11.3-4. 郡山)

古澤利武, 佐藤正明, 奥寺俊允, 鶴沼英郎: 試作非吸収性メンブレンによる抜歯窩に対する骨再生誘導法の効果.

第 32 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会(2012.11.3-4. 郡山)

中鉢辰也, 阿武俊郎, 坂元尚哉, 出口真次, 佐藤正明: 細胞核-細胞骨格結合が内皮細胞の力学応答に果たす役割.

第 46 回日本生体医工学会東北支部大会(2012.11.17. 仙台)

大谷祥一郎, 坂元尚哉, 佐藤正明: 空間的せん断応力勾配下における血管内皮細胞の遊走性. 第 46 回日本生体医工学会東北支部大会(2012.11.17. 仙台)

湊谷 勤, 古澤利武, 佐藤正明, 鶴沼英郎: 生体活性ガラス繊維織布を用いた組織再生. 日本バイオマテリアル学会(2012.11.26-27. 仙台)

古澤利武, 佐藤正明, 奥寺俊允, 鶴沼英郎: 抜歯直後に応用した PET/ゼラチン/SCP メンブレンの GBR 効果.

日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)

古澤利武, 押野郁恵, 川井貴裕, 吉田 翔, 佐藤正明, 奥寺俊允: 澱粉含有リン酸カルシウム骨ペーストの in vivo 骨伝導性. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)

川井貴裕, 古澤利武, 押野郁恵, 吉田 翔, 佐藤正明, 奥寺俊允: 澱粉含有 HA 顆粒の骨補填材としての効果.

日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)

Huang, W-J., Furusawa, T., Sato, M., Unuma, H.: Promotion of endothelial cell migration by low-crystallinity hydroxyapatite coatings on PET. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012(2012.11.26-27. 仙台)

出口真次, 松井 翼, 小松大貴, 佐藤正明: 骨格筋と似て非なる非筋細胞内アクチン・ミオシン微小繊維の力学特性. 第 33 回バイオメカニズム学術講演会(2012.12.15-16. 仙台)

## 2) 講演・シンポジウム

佐藤正明: 力学刺激に対する細胞応答のメカノバイオロジー. 新学術領域「バイオアセンブラ」シンポジウム(特別講演)(2012.3.8-9. 仙台)

佐藤正明: 動的イメージングによる細胞内力学伝達場の評価. 第 1 回多細胞動態研究のためのプレインストミング・ワークショップ(招待講演)(2012.6.26-27. 神戸)

佐藤正明: 細胞の力学応答のバイオメカニクス-細胞内における力とシグナルの伝達-. 京都大学再生医科学研究 所バイオメカニクスセミナー. (招待講演)(2012.7.18. 京都)

Sato, M.: Road to biomechanics research and cellular mechanobiology as my work. 2012 Summer School of the HeKKSaGOn Consortium(招待講演)(2012.9.17-26. Heidelberg, Germany)

佐藤正明: 細胞の力覚機構解明のためのメカノバイオロジー. 日本機械学会年次大会(基調講演)(2012.9.9-12 金沢)

佐藤正明: 細胞の力学的適応のバイオメカニクス. 京都大学再生医科学研究 所「再生医学・再生医療の先端融合的 共同研究拠点」平成 24 年度 学術講演会(招待講演)(2012.12.19. 京都)

Sato, M.: Dynamic response of endothelial cell and the cytoskeleton to fluid shear stress. Annual Symposium on Biomedical Engineering and Technology, Taiwan Society of Biomedical Engineering(特別講演)(2012.11.17-18. Chung Li, Taiwan)

# 再生統御学研究部門

## 再生増殖制御学分野 Department of Growth Regulation

分野主任 教授 瀬原(藤沢)淳子

Prof. Atsuko Sehara (Fujisawa)

### 【研究概要】

#### はじめに

発生過程では固有の形や大きさを持った臓器が生ずる。骨格筋など特定の臓器では、それが傷害を受けると再生するが、筋再生においては、筋衛星細胞と呼ばれる幹細胞が活性化され、それが発生過程と類似した細胞分化と形態形成のプロセスによって骨格筋を作り直すことが知られる。

我々の研究室は、主に発生生物学・細胞生物学の立場から、(1)筋分化・筋形成機構、筋再生機構、(2)形態形成における細胞間シグナリング・接着の制御機構としてのプロテアーゼ制御、を2本の柱として研究を行っている。主にマウスを用いた分子遺伝学的手法や培養系による研究とともに、ゼブラフィッシュを用いて、生きた個体でのバイオイメーキングによって形態形成過程を蛍光蛋白質により可視化し、発生や再生の新しい仕組みを明らかにしつつある。

- (1) **筋分化と筋形成・再生機構**：現在、成体筋幹細胞の性質や確立機構、胎児性筋前駆細胞との違いなどに焦点を当てた研究を行っている。筋発生過程の筋前駆細胞と同様に、成体骨格筋幹細胞は転写因子 Pax3/Pax7 を発現しているが、発生過程の筋前駆細胞と異なり、通常は静止期にある。この骨格筋幹細胞が静止状態を維持する上で Dicer による転写後制御機構の存在が明らかとなってきたが、どのような形で骨格筋幹細胞の静止期状態の維持に関わるのか不明な点が多い。そこで胚発生時期より成体にかけて骨格筋幹細胞として形成されてくる過程を、Pax3 と骨格筋へと運命決定されると発現する転写因子 MyoD の発現に注目し、それらの蛍光発現マウスにおける骨格筋幹細胞を単離する事で調査した。成長段階におけるマウス骨格筋幹細胞を回収し、miRNA 発現プロファイルを作製し、成長と共に発現レベルが上昇する miRNA 群を同定した。現在、その筋幹細胞の確立と維持におけるこれらの miRNA の役割と機能を検討中である。
- (2) **形態形成における細胞間シグナリング・接着のプロテアーゼ制御**：これは膜型シグナル分子や接着因子の脂質二重層近傍における切断(ectodomain shedding)を介して、細胞間シグナリングや接着の制御に関与する、ADAM と呼ばれる膜型プロテアーゼファミリーに着目した研究である。テーマ(1)の中から発展させてきた研究であるが、筋形成にとどまらず、発生の時間的空間的制御、不可逆的な制御としてきわめて大切な制御であることを明らかにしてきた。現在神経堤細胞で発現する ADAM19 の心臓形成や神経組織形成における役割と機能や、マクロファージ等の血液細胞で発現する ADAM8 の役割と機能に関する研究を行っている。また、ADAM の基質となりうる膜型増殖因子が、神経前駆細胞からの神経細胞の産生に関与することを見いだした。これらの研究においては、マウスとともに、母体外で発生し透明性が高く発生過程を生きたまま観察できるゼブラフィッシュ胚を用いて研究を行っている。それは、発生過程における細胞の挙動をこれらのプロテアーゼがどのように制御しているかを生きた個体の中で調べることができるからである。

紙面の関係上そのすべてをここで紹介するのは難しいため、年報ではひとつのテーマに関してやや詳しく紹介することになっている。今年度は、発生過程の筋前駆細胞の再生筋への移植能を検討し、これが移植可能であることを見いだした、酒井大史を中心に行われた研究を紹介する。

## 発生過程の筋前駆細胞は、成体再生筋への移植によりその筋再生に寄与しうる

### 研究の背景

筋ジストロフィーは、筋繊維の変性・壊死を主な病変とし、臨床的には進行性の筋力低下をとる遺伝性疾患である。中でもデュシェンヌ型筋ジストロフィー(Duchenne muscular dystrophy, DMD)は、X染色体上のジストロフィン遺伝子に変異・欠損があり、骨格筋細胞膜で機能するジストロフィタンパク質が欠損しているために、骨格筋が損傷する疾患で、筋ジストロフィーの中で最も頻度が高く、また進行性で有効な治療法もないのが現状である。

DMDに対する治療法として、現在注目されている治療法のひとつが細胞移植療法である。骨格筋は、筋芽細胞が分化し、それが互いに細胞融合して生ずる筋管からなる組織である。この細胞融合の性質を利用して正常なジストロフィンを産生しうる細胞をDMD筋に移植すれば、この細胞は細胞融合によってDMD筋に取り込まれ、正常なジストロフィンを発現する骨格筋となり、筋ジストロフィーの進行を食い止めることができるはずである。前述のように、もともと骨格筋には筋衛星細胞という幹細胞があり、筋が損傷されるとこの幹細胞が増殖・分化して再生筋をつくる。従って、正常な筋幹細胞を効率よく増やす方法が見つかれば、これが移植細胞としては最適なのではあるが、残念ながら現在のところ、この細胞を筋幹細胞としての性質を保ったまま移植に必要な量まで増殖させることができていない。

一方、近年山中らによって開発されたiPS細胞は、ES細胞とほぼ同等の多能性幹細胞としての増殖能と多分化能をもつ。iPS細胞から筋前駆細胞を誘導できれば、筋移植のソースとしてきわめて有用と考えられる。ただ現段階では、ES細胞やiPS細胞から誘導された筋前駆細胞は、培養すると確かに筋細胞の形成を観察することはできるが、DMD筋への移植効率は低く、これを用いてジストロフィン欠損マウスの症状が緩和された、という報告は世界的にもなされていない。問題は、そもそも胎児型の筋前駆細胞を成体のDMD筋に移植した場合、筋衛星細胞と同様に効率よく再生筋に取り込まれる能力があるのかどうか、はっきりと示されたことがなかったことである。

そこで我々は、酒井を中心に、胎児型の筋前駆細胞には成体再生筋への移植能があるのか、そしてその効率は筋衛星細胞に匹敵するものかどうか、を検討した。

### 実験方法

(1) マウス 骨格筋前駆/幹細胞を単離するために、*Pax3<sup>GFP/+</sup>* (パスツール研究所・マーガレット・パッキングム教授から分与)、*Rosa26<sup>CAG-LSL-tdTomato/+</sup>* (ジャクソンラボラトリーから購入、*R26R<sup>RFP</sup>*)、*Tg: MyoD-Cre* の3系統を使用した。細胞移植を受けるマウスとして、*DMD-null* (北里大学・花岡和則教授から分与)マウスを使用した。(2) 細胞単離 胎仔性骨格筋前駆細胞(Fetal skeletal muscle progenitors, FMPs)を単離するため、この細胞で発現する*Pax3*遺伝子制御下でGFPを発現する*Pax3<sup>GFP/+</sup>*マウス、ならびに骨格筋への運命決定に必要な転写因子をコードする*MyoD*遺伝子の制御下でCreを発現し、筋前駆細胞から筋系列に入った細胞でRFPが活性化される*Pax3<sup>GFP/+</sup>; MyoD-Cre; R26R<sup>RFP</sup>*マウスの16.5日齢胚から、腕および横隔膜を採取した。一方、比較する骨格筋衛星細胞(Satellite cells, SCs)を単離するために、8-12週齢の*Pax3<sup>GFP/+</sup>*マウスの横隔膜ならびに腹筋を採取した。FACS Aria II Cell sorterを用いて、(Pax3)GFP陽性細胞ならびに(Pax3)GFP陽性；(MyoD)RFP陽性あるいは(Pax3)GFP陽性；

(MyoD)RFP 陰性細胞を単離した。(3)単離した細胞の培養 単離した FMPs と SCs を 4 日間骨格筋増殖培地で培養後、3 日間骨格筋分化培地で培養した。培養後 1-6 日目に、MyoD と Myogenin の免疫染色を行った。(4)単離した細胞の移植 移植を行う前日に、移植を受けるマウス (*DMD-null*, *DMD-null*; *nude*) の前脛骨筋 (tibialis anterior, TA) に  $10\mu\text{m}$  のカルジオトキシンを投与し、筋再生を誘導し、そこへ単離した FMPs と SCs ( $2 \times 10^4$  個) を筋肉内注射した。移植 2 週間後に、移植された TA を回収し、ジストロフィンの発現を調べた。(5)単離した細胞の表面抗原ならびに遺伝子発現解析 上述のように単離した細胞の表面抗原である CD34 の発現を FACS Aria II で解析した。また、Pax3, Pax7, Myf5, MyoD, Myogenin の発現を qPCR により比較解析した。

## 結 果

骨格筋分化能を *in vitro* で比較するために、FMPs と SCs を骨格筋増殖培地、骨格筋分化培地で培養すると、それぞれの細胞培養 2 日目には FMPs と SCs はいずれも 90% 以上の細胞が MyoD を発現し、両者の筋分化能に大きな差はみられなかった(図 1)。ところが、ジストロフィン欠損マウスである *DMD-null* マウスの TA に、FMPs と SCs を移植して FMPs と SCs の、骨格筋への移植効率を比較したところ、移植後 2 週目において、FMPs, SCs のどちらの移植を受けた TA でも、ジストロフィンの発現回復がみられたが、FMPs よりも SCs の移植を受けた TA において、有意に、より多数のジストロフィン陽性線維が観察された(図 2)。この結果から、胎児由来筋前駆

細胞には、成体の骨格筋に移植した場合、筋衛星細胞と同様に筋形成に寄与する活性があるが、その効率は後者に比べ低いことがわかった。

SCs の移植において、MyoD の発現上昇が、SCs の移植効率を下げるという報告がある。そこで次に FMPs においても、MyoD の発現が移植効率に影響を与えているかどうかを検討するため、*Pax3<sup>GFP/+</sup>; MyoD-Cre; R26R<sup>RFP</sup>* マウスを用いて、MyoD を発現した(MyoD)RFP 陽性 FMPs と、MyoD を発現したことがない(MyoD)RFP 陰性 FMPs を単離し、これらの移植能を比較した。(MyoD)RFP 陽性 FMPs,

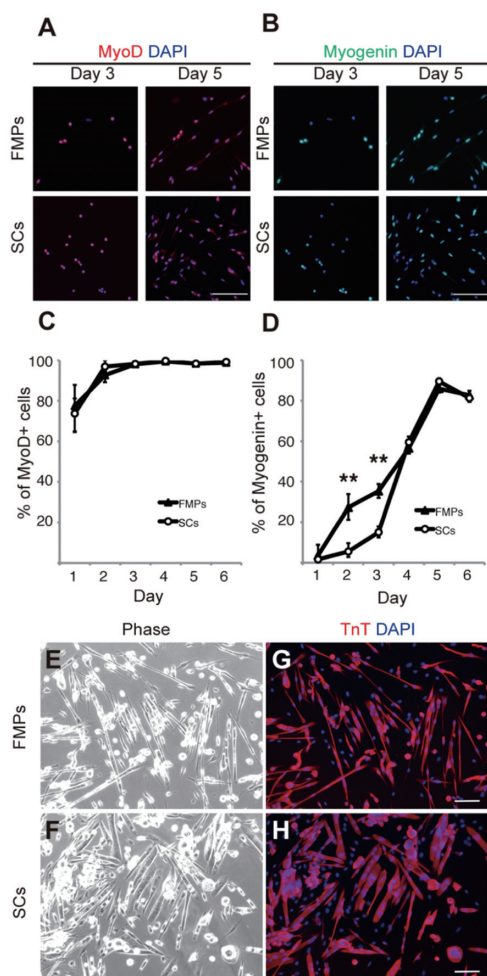


図 1 培養下における FMPs は SCs と同様の筋分化能を有する

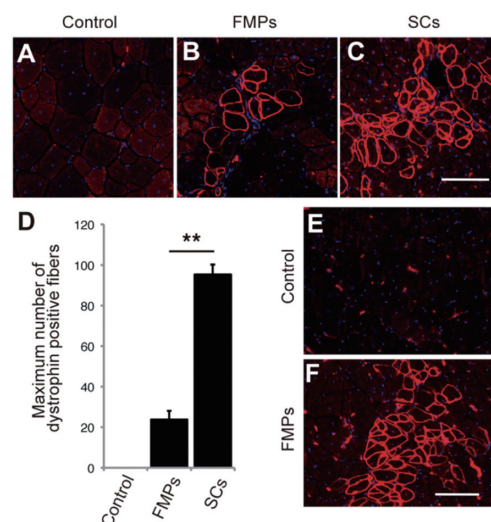


図 2 成体 DMD 筋に移植された FMPs は再生筋形成に寄与するがその効率は SCs より低い



(MyoD)RFP 陰性 FMPs のどちらを移植しても、RFP の蛍光発現と、ジストロフィンの発現回復がみられたが、(MyoD)RFP 陽性 FMPs の方が、移植効率が高いことがわかった(図 3)。

では、このような移植効率の差が生ずる原因は何か。それぞれの細胞集団の移植効率の差の原因を探索するため、表面抗原、ならびに遺伝子発現の差を検討した。ほとんどすべての SCs は CD34 を発現しているのに対し、(MyoD)RFP 陰性 FMPs、(MyoD)RFP 陽性 FMPs の CD34 発現細胞はいずれも約 60% で、SCs よりやや低かった。SCs で発現が知られている筋転写因子である Pax3, Pax7, Myf5, MyoD, Myogenin の発現を qPCR で比較したところ、いずれの転写因子の発現も、SCs で最も高かった。(MyoD)RFP 陰性 FMPs、(MyoD)RFP 陽性 FMPs 比較すると、ほぼ同等、あるいは(MyoD)RFP 陽性 FMPs で高かった(図 4)。

## 考 察

今回の実験で、FMPs と SCs の *in vitro* での分化効率はほぼ同等であったが、*in vivo* での移植効率は、SCs のほうが高いことが判明した。これは、培養における分化効率からは移植効率を予測できないことを示している。

(MyoD)RFP 陰性 FMPs、(MyoD)RFP 陽性 FMPs、SCs を比較すると、一度 MyoD を発現した(MyoD)RFP 陽性 FMPs あるいは SCs の移植効率が高かった。また、骨格筋分化に重要な転写因子の発現も、(MyoD)RFP 陽性 FMPs あるいは SCs において高かった。SCs は、その発生過程において、一度 MyoD を発現しているが、静止期ではその発現がみられない。このことから、移植効率には、MyoD の発現ではなく、その発現履歴が影響しており、骨格筋の治療目的に使う細胞は、MyoD を一度発現した骨格筋分化の進んだ細胞を使うことが重要であることが示唆された。何より、胎児型の筋前駆細胞には、成体再生節への移植能があることが示された。

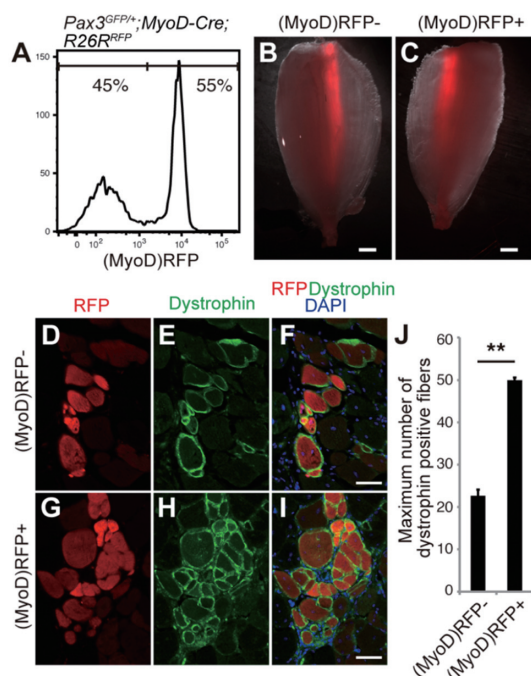


図 3 MyoD の発現履歴を持つ FMPs の方が、発現履歴のない FMPs より移植能が高い。

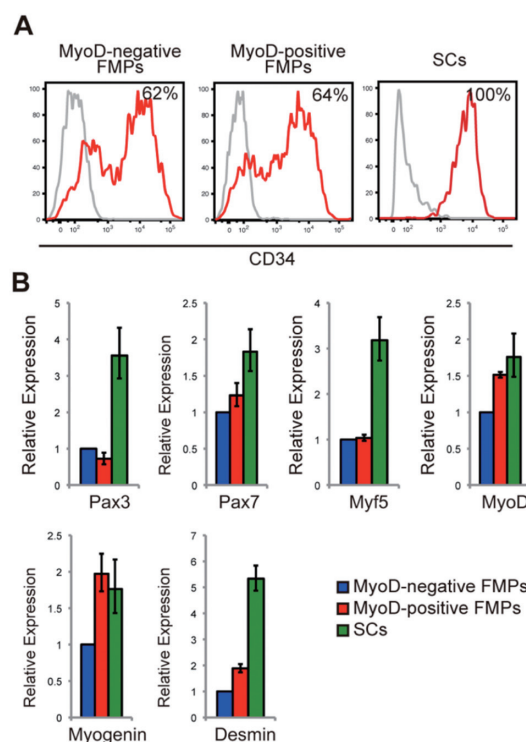


図 4 移植能が高い細胞ほど、総じて筋系列転写因子の発現レベルが高い

We are interested in molecular and cellular mechanisms of organ development and regeneration, especially from an aspect of cell-cell interactions required for morphogenesis and their spatial and temporal regulation. Our



research is now focusing on following topics : (1) molecular mechanisms of skeletal myogenesis and muscle regeneration, and (2) regulatory roles of ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) family proteins in cell-cell interactions and the ectodomain shedding during development.

Here we introduce one of our research topics on a regenerative capacity of fetal skeletal muscle progenitors after intramuscular engraftment in dystrophin deficient mice. Muscle satellite cells (SCs) are stem cells that reside in skeletal muscles and contribute to regeneration upon muscle injury. SCs arise from skeletal muscle progenitors expressing transcription factors Pax3 and/or Pax7 during embryogenesis in mice. However, it is unclear whether these fetal progenitors possess regenerative ability when transplanted in adult muscle. Here we address this question by investigating whether fetal skeletal muscle progenitors (FMPs) isolated from *Pax3<sup>GFP/+</sup>* embryos have the capacity to regenerate muscle after engraftment into Dystrophin-deficient mice, a model of Duchenne muscular dystrophy. The capacity of FMPs to engraft and enter the myogenic program in regenerating muscle was compared with that of SCs derived from adult *Pax3<sup>GFP/+</sup>* mice. Transplanted FMPs contributed to the reconstitution of damaged myofibers in Dystrophin-deficient mice. However, despite FMPs and SCs having similar myogenic ability in culture, the regenerative ability of FMPs was less than that of SCs in vivo. FMPs that had activated *MyoD* engrafted more efficiently to regenerate myofibers than MyoD-negative FMPs. Transcriptome and surface marker analyses of these cells suggest the importance of myogenic priming for the efficient myogenic engraftment. These results are discussed in the context of cell therapy with the pluripotent stem cells derived myogenic progenitors.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Suzuki, K., Hayashi, Y., Nakahara, S., Kumazaki, H., Prox, J., Horiuchi, K., Zeng, M., Tanimura, S., Nishiyama, Y., Osawa, S., Sehara-Fujisawa, A., Saftig, P., Yokoshima, S., Fukuyama, T., Matsuki, N., Koyama, R., Tomita, T., Iwatsubo T.. Activity-dependent Proteolytic Cleavage of Neuroligin 1. *Neuron*, 2012 : 76(2): 410-22.
- Sakurai, H., Sakaguchi, Y., Shoji, E., Nishino, T., Maki, I., Sakai, H., Hanaoka, K., Kakizuka, A., Sehara-Fujisawa, A.. In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, 2012 : 7(10): e47048.
- Atsuko Sehara-Fujisawa. Roles and Functions of Meltrin beta / ADAM19. *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3<sup>rd</sup> Edition (Editor in Chief : Rawlings & Salvesen), Academic Press

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 学会・研究会発表

- Atsuo Iida, Anna Tomosawa, Kazuya Sakaguchi, Sigenobu Yonemura, Atsuko Sehara-Fujisawa : The onset of primitive blood circulation regulates the timing of blood vessel. Joint Meeting of the British Societies for Cell Biology, Developmental Biology and the Japanese Society for Developmental Biology (2012.4.15. Coventry, UK)

Atsuo Iida, Anna Tomosawa, Kazuya Sakaguchi, Daigo Nishimura, Atsuko Sehara-Fujisawa : Vascular formation requires crosstalks between endothelial cells and primitive erythroblasts at the early stage of their development. 第45回発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会(2012.5.30. 兵庫)

Anna Tomosawa : Roles of a transmembrane metalloprotease ADAM10 in zebrafish vasculogenesis. 第7回研究所ネットワーク国際シンポジウム(2012.6.14. 宮城)

Emi Shoji : Modelling Duchenne muscular dystrophy(DMD) with human induced pluripotent stem cells. 第7回研究所ネットワーク国際シンポジウム(2012.6.14. 宮城)

Sakai, Hiroshi, Sato, Takahiko, Sakurai, Hidetoshi, Hanaoka, Kazunori, Montarras, Didier, Buckingham, Margaret, Sehara-Fujisawa, Atsuko : ENGRAFTMENT OF MOUSE FETAL MYOGENIC PROGENITORS INTO DYSTROPHIC MUSCLES. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> Annual Meeting(2012.6.15. 神奈川)

Nishimura, Daigo, Sakai, Hiroshi, Sato, Takahiko, Iida, Atsuo, Sato, Fuminori, Bartsch, Jörg W., Sehara-Fujisawa, Atsuko : ROLES OF ADAM8 FOR SKELETAL MUSCLE REGENERATION. International Society for Stem Cell Research 10<sup>th</sup> Annual Meeting(2012.6.15. 神奈川)

瀬原淳子, 佐藤貴彦 : 筋発生機構に基づいた iPS 細胞からの筋前駆細胞の作成・単離法の開発－骨格筋幹細胞形成に関与する転写後調節機構の解明－, 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」平成24年度研究班会議(2012.12.6. 東京)

瀬原淳子, 桜井英俊 : 筋発生機構に基づいた iPS 細胞からの筋前駆細胞の作成・単離法の開発－患者由来 iPS 細胞を用いた筋ジストロフィーに対する創薬研究基盤の開発－, 精神・神経疾患研究開発費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」平成24年度研究班会議(2012.12.6. 東京)

佐藤貴彦, 平向洋介, 瀬原淳子 : 成体骨格筋幹細胞の形成に関与する転写後調節機構探求, ワークショップ IW9I 骨格筋幹細胞研究の最前線(Frontiers of muscle stem cell research)(オーガナイザー: 小野悠介, 橋本有弘), 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.11. 福岡)

庄子栄美, 桜井英俊, 中畑龍俊, 田中章仁, ウォルツェンク スート, 藤井宣晴, 平家敏男, 真鍋康子, 瀬原-藤沢淳子 : デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞を用いての病態再現, 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.12. 福岡)

西邨大吾, 飯田敦夫, 坂口和弥, 杉山立樹, 長澤丘司, 千葉彩乃, 望月直樹, パーツ, J. W., 瀬原淳子 : 血液の発生と挙動における ADAM8 の役割, ワークショップ 3W6I 細胞外プロテオリシスによる細胞挙動の制御(Extracellular proteolysis in cell behavior, and beyond)(オーガナイザー: 瀬原淳子, 西脇清二), 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.13. 福岡)

佐藤智美, 佐藤文規, 坂口和弥, 谷米竜馬, 亀崎青沙, 栗崎知浩, 瀬原淳子 : 発生過程のゼブラフィッシュ脳の神経細胞の産生における ErbB4 シグナルの役割, 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.13. 福岡)

D. Nishimura, H. Sakai, T. Sato, F. Sato, J.W. Bartsch, A. Sehara-Fujisawa : Roles of ADAM8 in skeletal muscle regeneration. The American Society for Cell Biology 2012 Annual Meeting(2012.12.15 San Francisco. USA)

## 2) 講演・シンポジウム

Atsuko Sehara-Fujisawa : Roles of ADAM proteases in development of zebrafish. Seminar in Kennedy Institute of Rheumatology(2012.4.19. London, UK)

Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of ADAM family metalloproteases in cardiovascular development. Developmental Biology Seminar Series Easter 2012 (2012.4.20. Cambridge, UK)

瀬原淳子：ヘビ毒出血因子のルーツを探る，平成 24 年度日本生化学会九州支部例会シンポジウム (2012.5.26. 福岡)

飯田敦夫：脈管形成を円滑に進めるための血管内皮細胞－赤芽球の相互作用，第 2 回 Dev. Boil. Just Do It の会 (2012.5.27. 兵庫)

Atsuo Iida: Vascular formation requires crosstalks between endothelial cells and primitive erythroblasts at the early stage of their development. 第 7 回研究所ネットワーク国際シンポジウム (2012.6.14. 宮城)

瀬原淳子：生きたゼブラフィッシュを用いて ADAM プロテアーゼの役割と機能に迫る，シンポジウム 24 朱に交われば赤くなる～細胞外環境が引き起こす器官形成と再生機構 (座長：瀬原淳子，阪井丘芳)，第 12 回日本抗加齢医学会総会 (2012.6.24. 神奈川)

Atsuko Sehara-Fujisawa: Exploring Roles of ADAM Proteases in Development using Zebrafish. NUS/TLL/NIBB JOINT PRACTICAL WORKSHOP ON Genetics, Genomics & Imaging in Medaka and Zebrafish (2012.7.26. Singapore, Singapore)

瀬原淳子：ゼブラフィッシュの筋維持における増殖因子の役割とその制御，シンポジウム 5 宇宙生物学 (オーガナイザー：東谷篤志，東端 晃)，第 26 回日本宇宙生物科学会 (2012.9.28. 徳島)

## 再生免疫学分野 Department of Immunology

分野主任 教授 河本 宏

Prof. Hiroshi Kawano

### 【研究概要】

造血においては多能造血幹細胞から順次分化能が限定されていき、いろいろの系列の単能前駆細胞が生成する。我々の研究室が目標としていることは、この分化能限定過程において、前駆細胞の運命を振り分ける分子機構を解析することである。我々は研究成果に基づいて新しい造血モデルとして「ミエロイド基本型モデル」を提唱してきた。一般に流布してきた古典的造血モデルとは異なり、このモデルでは、エリスロイド、T細胞、B細胞への分化に向かう経路において、ミエロイド細胞への分化能を保持するとしている。造血過程の全体を研究対象としているが、中でもT細胞に至る過程に比重を置いて研究を進めている。一方、再生した免疫細胞を用いた免疫細胞療法の開発も行っており、以下にその方向性で行った研究の成果を紹介する。

#### ・iPS細胞技術を用いてがん抗原特異的T細胞を再生させる

今回の研究では、がん抗原に反応するT細胞を、iPS細胞技術を用いて再生することを目的とした(図1)。

がん患者の体内には、がんを殺す能力を持つキラーT細胞が存在する。しかし、T細胞の多くはがん細胞によって無力化されていて、働ける状態のT細胞はごく少数である。現行のがん免疫療法では、その少数のT細胞を刺

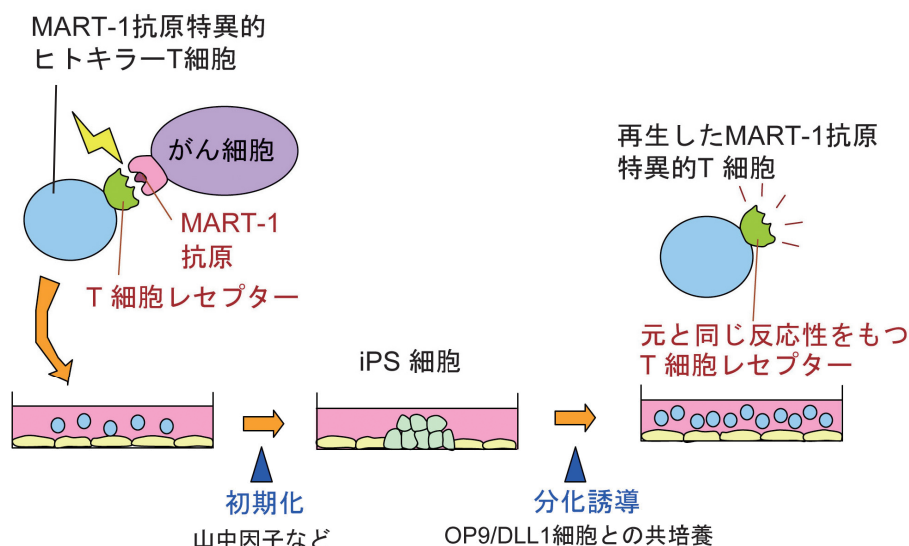


図1 iPS細胞技術を用いたキラーT細胞の再生

がん抗原 MART-1 特異的キラーT細胞からiPS細胞を作製した。そのiPS細胞からT細胞を分化誘導すると、再生したT細胞のほぼすべてがMART-1抗原への反応性を示した。

Fig. 1 Regeneration of cytotoxic T cells using the iPS technology

iPS cells were produced from human CD8<sup>+</sup> T cells specific for the tumor antigen MART-1, and CD8<sup>+</sup> T cells with the same antigen specificity were regenerated in vitro from these iPS cells. The present study thus illustrates an approach for expanding antigen-specific T cells applicable in cell-based therapy of cancer.

激して働かせるという戦略を取っている。しかし、働ける T 細胞の数が少ないうえに、刺激を受けた後の T 細胞の寿命が短く効果が長続きしないという問題があり、これががんの免疫療法の効果を薄めている。本研究では、iPS 細胞作製技術と T 細胞の分化誘導技術を組み合わせることにより、そうした状況を打破しようと試みた。

我々は、ヒト悪性黒色腫細胞に特有のがん抗原である MART-1 抗原と反応できる T 細胞に山中因子などを作用させて iPS 細胞を作製した。これを MART-1-TiPS 細胞と名付ける。

T 細胞は、さまざまな抗原に対して特異的に反応できるが、どの抗原に反応するかは T 細胞レセプターによって決まる。T 細胞レセプターの遺伝子は、ゲノム中のレセプター遺伝子の断片を再構成することによってつくられたものである。T 細胞から iPS 細胞を作製すると、遺伝子再構成でつくられた遺伝子の情報も引き継がれるので、そのような iPS 細胞から T 細胞を分化誘導すると、元の T 細胞と同じ反応性の T 細胞レセプターを発現するようになる考えた。

iPS 細胞から T 細胞を分化誘導したところ、生成した T 細胞のほぼ全てが、元のがん抗原と反応できる T 細胞レセプターを発現した。また、これらの T 細胞は元のがん抗原に反応することが確認できた。この成果は、がん免疫療法が直面する T 細胞の数の少なさ、T 細胞の寿命の短さという問題点を、一挙に解決できる可能性を示している。

The major aim of our laboratory is to elucidate the molecular mechanisms that regulate cell fate decisions in the process of lineage restriction from multipotent hematopoietic stem cells to unipotent progenitors. A series of studies from our laboratory on early hematopoiesis have led to a fundamental redefinition of lymphoid progenitors as well as the ontogeny and phylogeny of T- and B-cell development. We thus have proposed our original model of hematopoiesis, namely “myeloid-based model”, in which myeloid potential is retained along with specification pathway towards erythroid, T, and B cell lineages. Among various events occurring during hematopoiesis, we are mainly focusing on the process towards the production of T cells. On the other hand, we are also studying on the regeneration of immune cells that are potentially useful in immune cell therapy. The following is one of such approaches.

#### **Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived from mature CD8<sup>+</sup> T cells**

Antigen-specific T cells represent a potential therapeutic avenue for a variety of conditions, but current approaches for generating such cells for therapeutic purposes are limited. In this study, we established iPS cells from mature cytotoxic T cells specific for the melanoma epitope MART-1 (Fig 1). When co-cultured with OP9/DLL1 cells, these iPS cells efficiently generated TCR $\beta$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive (DP) cells expressing a T cell receptor (TCR) specific for the MART-1 epitope. Stimulation of these DP cells with anti-CD3 antibody generated a large number of CD8<sup>+</sup> T cells, and more than 90% of the resulting cells were specific for the original MART-1 epitope. Stimulation of the CD8<sup>+</sup> T cells with MART1 antigen-presenting cells led to the secretion of IFN $\gamma$ , demonstrating their specific reactivity. The present study therefore illustrates an approach for cloning and expanding functional antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells that might be applicable in cell-based therapy of cancer.



## 【業績目録】

## ◆ 誌上発表 ◆

## 1) 原著論文

- Vizcardo, R., Masuda, K., Yamada, D., Ikawa, T., Shimizu, K., Fujii, S-I., Koseki, H., Kawamoto, H. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPS cells derived from mature CD8<sup>+</sup> T cells. *Cell Stem Cell*. **12** : 31-36(2013).
- Katagiri, T. \*, Kawamoto, H. \*, Nakakuki, T. \*, Ishiyama, K., Okada-Hatakeyama, M., Ohtake, S., Seiki, S., Hosokawa, K. Nakao, S. (\*equal contribution) Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages. *Stem Cells*. **31** : 536-546(2013).
- Isoda, T., Takagi, M., Piao, J., Nakagama, S., Sato, M., Masuda, K., Ikawa, T., Azuma, M., Morio, T., Kawamoto, H., Mizutani, S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood*. **120** : 789-799(2012).
- Seo, W., Ikawa, T., Kawamoto, H., Taniuchi, I. Runx1-Cbfb facilitates early B lymphocyte development by regulating expression of Ebfl. *J Exp Med*. **209** : 1255-1262(2012).
- Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Shigeura, T., Motomura, Y., Yasuda, T., Satoh, R., Yoshida, H., Kubo, M., Kawamoto, H., Koseki, H., Taniguchi, M. Development and function of invariant natural killer T cells producing t(h)2- and t(h)17-cytokines. *PLOS Biology*. **10** : e1001255(2012).

## 2) 講演・シンポジウム

- 河本 宏 造血における前駆細胞の系列決定の過程 日本免疫治療学研究会学術集会 教育講演(2012.2.18. 東京)
- 河本 宏 造血幹細胞から T 前駆細胞に至る系列決定の過程 日本造血細胞移植学会総会 教育講演(2012.2.24. 大阪)
- 河本 宏 造血における前駆細胞の系列決定の過程 日本免疫学会サマースクール 免疫学会賞受賞記念講義(2012.7.26. 那須)
- 河本 宏 造血液細胞の新しい分化モデル 北野病院コアレクチャー(2012.7.30. 大阪)
- 河本 宏 Molecular mechanisms for production and maintenance of T cell lineage 新学術領域「細胞運命制御」国際シンポジウム(2012.11.6. 京都)
- 河本 宏 Lymphocyte Development 香港大学パスツール研究所 Immunology Course 講義(2012.11.19. 香港)
- 河本 宏 新しい造血モデルによる古典的概念からの脱却 大阪大学医療組織工学フォーラム(2012.12.3. 大阪)
- 河本 宏 Epigenetic mechanisms maintaining the T cell and thymic epithelial cell lineage 日本免疫学会学術集会シンポジウム「Lymphocyte development」(2012.12.5. 神戸)

# 再生医学応用研究部門

## 生体修復応用分野 Department of Biological Repair

分野主任 教授 高橋 淳

Prof. Jun Takahashi

### 【研究概要】

我々は、胚性幹細胞(ES細胞)と人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた神経難病治療法開発を目指している。なかでも、胎児黒質細胞移植によって臨床経験が蓄積されているパーキンソン病を主な対象疾患として、ドーパミン神経細胞の誘導、細胞移植による神経症状の改善に関する研究を行っている。この細胞移植療法においては、効率的な神経誘導、腫瘍形成抑制のための細胞選別、移植細胞の生存維持、長期効果と安全性の確認など検討すべき点が多々あり、現在はこれらをひとつひとつ解決している。将来的には、細胞移植や脳深部刺激療法などを含めた総合的な神経難病治療に繋がりたいと考えている。

2012年は、ヒトES細胞から誘導した神経前駆細胞の霊長類パーキンソン病モデルへの移植結果を報告した(図1, 2)。まず未分化なES細胞が残る細胞(神経分化誘導14日)では移植後9か月経ってもヒトES細胞が脳内で増殖を続けており、境界鮮明で悪性所見はないが腫瘍形成がみられた。一方、42日間神経分化誘導した細胞は未分化ES細胞を含まず霊長類パーキンソン病モデル脳内では腫瘍形成をきたさなかった。移植後3か月目から症状の改善がみられ、12か月後に脳切片を調べたところ多くのドーパミン神経細胞が生着していた。これらの結果からES、iPS細胞を用いた細胞移植はパーキンソン病治療に有効であるということが考えられる。

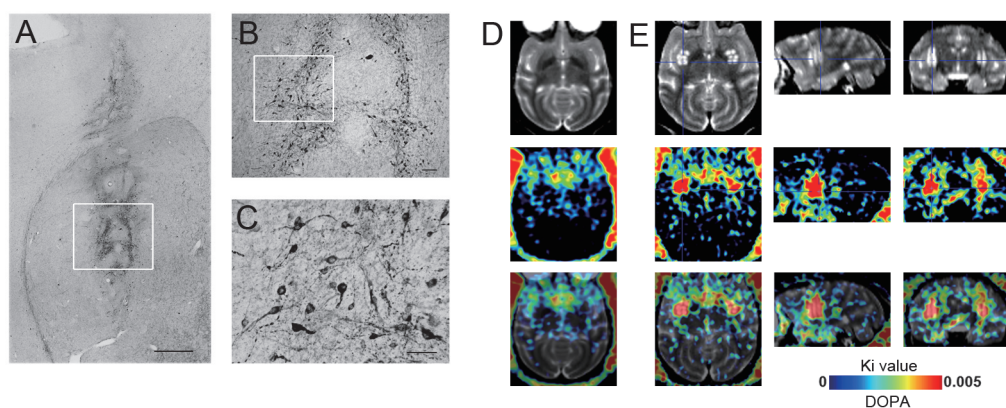


図1 カニクイザル脳内に生着したヒトES細胞由来ドーパミン神経細胞

(A, B, C) 42日間分化誘導した細胞をカニクイザル脳(線条体)に移植し、12か月後に行ったドーパミン神経細胞マーカー(チロシン水酸化酵素: TH)に対する免疫染色。B, CはそれぞれA, Bの枠内の拡大写真。(D, E) 上段は移植12か月後のT2強調MRI画像、中段は $^{18}\text{F}$ -DOPAのPET画像で、下段はこれらを重ね合わせたもの。Dは培養培地のみを注入したコントロールでEは分化誘導42日後の細胞を移植したサルだが、移植片に一致して $^{18}\text{F}$ -DOPAの取り込みが上昇している、すなわち移植された細胞がドーパミン神経として機能していることが分かる。

Fig. 1 The DA differentiation of the human ESC-derived NPCs in the monkey brain

(A) The gross appearance of the d42-graft with DAB staining for TH. Bar = 1mm. (B) The image of the boxed area in A. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . (C) A magnified image of the boxed area in B. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . (D, E) T2-weighted MR images(upper), DOPA-PET images(middle), and combined MR and DOPA-PET images(bottom) of the monkeys injected with culture medium only(D, control), or with d42-spheres (E) at 12 months.

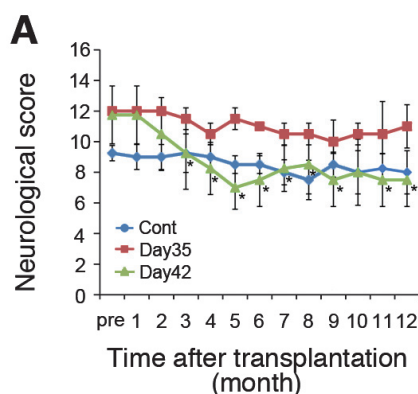


図2 35日間あるいは42日間分化誘導した細胞を移植した後のカニクイザルパーキンソン病モデルの症状変化

(A) 縦軸は歩行状態や振戦などの神経症状をスコア化したもので、数が多いほど重症。横軸は手術前から移植後12か月目までの期間。42日分化誘導した細胞を移植した時のみ移植3か月後から移植前と比べて有意な症状改善がみられ12か月後まで持続した。

**Fig. 2 The behavioral changes of the monkeys after transplantation of d35- or d42-spheres**

(A) The time course of changes in the neurological scores of the monkeys injected with culture medium only (control, blue,  $n=4$ ), or implanted with d35- (red,  $n=2$ ) or d42-spheres (green,  $n=4$ ). The data are presented as the means  $\pm$  s.d. A repeated ANOVA including group and repeated rating of scores as factors disclosed that there was a significant interaction between the group and repeated rating of scores ( $F(24,84) = 4.17, p < 0.001$ ), indicating that the time course changes of the scores were different among the three groups. Furthermore, a repeated ANOVA for the rated scores in each group revealed that a significant effect of time was found in the rated scores only in the group implanted with d42-grafts ( $F(12,36) = 25.8, p < 0.001$ ). A post-hoc analysis in this group, by a pair-wise comparison of the scores between pre- and each time point post-graft, revealed a significant decrease in the scores at 3-9, 11 and 12 months post-transplantation (Bonferroni corrected  $*p < 0.05$ ).

また、我々は移植細胞の増殖を抑制するために $\gamma$ セクレターゼ阻害剤の利用を試みた(図3,4)。この薬物はNotchシグナルを阻害することで神経前駆細胞の増殖を抑え神経細胞への分化を促進する。 $\gamma$ セクレターゼ阻害効果のある低分子化合物(DAPT, Compound E)を移植前に4日間作用させることで細胞の増殖が抑制され、移植片の大きさが小さくなることが明らかとなった。さらに移植片内の神経前駆細胞が減り、成熟神経細胞の割合が大きくなった。すなわち、 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤で移植前の神経前駆細胞を処理することによって、移植細胞の神経分化が促進され腫瘍形成の可能性が減少することが期待される。

We are developing a cell replacement therapy for the neurological disorders by using stem cells, especially embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). The main target is Parkinson's disease, and our research focuses on induction of dopaminergic (DA) neurons from these cells and transplantation of the cells into the brain to improve neurological symptoms. So far, we have demonstrated that transplantation of monkey ESC-derived neurons improved the Parkinsonian symptoms of the monkey models. In addition, we have revealed a method to prevent tumor formation. Now, we are inducing DA neurons from human ESCs and iPSCs, and developing a safe and efficient method for clinical application of these cells.

In 2012, we have reported the results of transplantation of human ESC-derived neural progenitor cells (NPCs) into primate models Parkinson's disease. We have herein, for the first time, compared the growth and function of human ESC-derived cells with different stages of neural differentiation implanted in the brains of primate models of Parkinson's disease. We herein show that residual undifferentiated cells expressing ESC markers present in the cell preparation can induce tumor formation in the monkey brain. In contrast, a cell preparation matured by 42-day-culture with BDNF/GDNF treatment did not form tumors, and survived as primarily dopaminergic neurons. In addition, the monkeys with such grafts showed behavioral improvement for at least 12 months. These results support the idea that human ESCs, if appropriately matured, can serve as a source for dopaminergic neurons without forming any tumors in a primate brain.

We have also attempted to reduce the tumor formation. Immature NPCs in the grafts can proliferate unpredictably, resulting in neural overgrowth and long-term risks of compressing the surrounding host tissue.

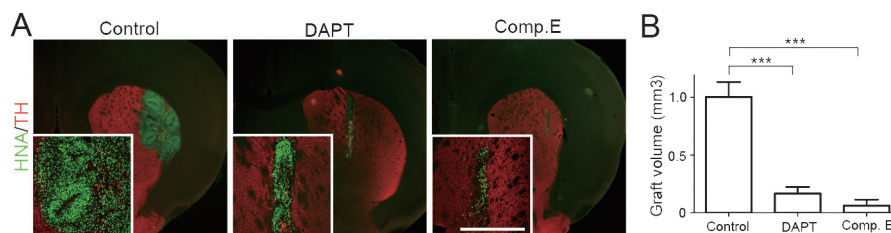


図3  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤処理の有無による移植片サイズの違い

(A) ヒト iPSC 細胞由来の神経前駆細胞を免疫不全マウス脳に移植し 8 週後に行った脳切片の免疫染色。HNA はヒトに特異的な抗核抗体でヒト iPSC 細胞由来細胞を示す。(B) 移植片サイズの比較。 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤で移植前に処理した群では移植片は有意に小さい。

**Fig. 3 Histologic analyses of human iPSC-derived grafts with or without GSI pretreatment**

(A) Representative immunohistologic image of a graft from each group at 8 weeks post-transplantation. The iPSC-derived NPCs were pretreated with GSIs for 4 days, and transplanted into the SCID mice. Control grafts pretreated with DMSO were large with numerous neural rosettes, whereas GSI-treated grafts did not show overgrowth. Scale bar, 500  $\mu$ m. (B) Graft volume was estimated for each animal. Pretreatment with GSIs significantly reduced the graft volume. Control : n = 7 ; DAPT : n = 4 ; compound E : n = 6.

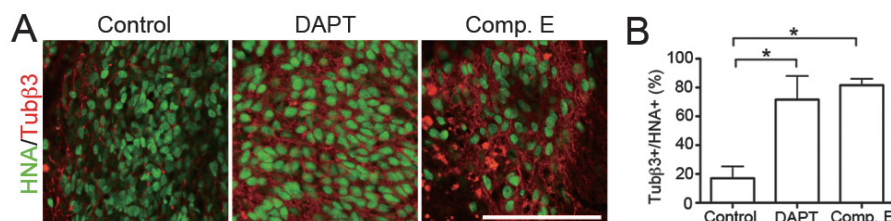


図4  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤処理の有無による神経分化の違い

(A) ヒト iPSC 細胞由来の神経前駆細胞を免疫不全マウス脳に移植し 8 週後に行った脳切片の免疫染色。Tubβ3 は最終分裂を終えた神経細胞を示す。(B) 移植された細胞全体における神経細胞の割合の比較。 $\gamma$ セクレターゼ阻害剤で移植前に処理した群では神経分化が促進されている。

**Fig. 4 Characterization of viable grafts pretreated with GSIs**

Graft cells positive for Tubβ3 and HNA. Grafts pretreated with GSIs primarily contained a more homogenous population of mature Tubβ3<sup>+</sup> neurons. Scale bars, 100  $\mu$ m.

Because Notch signaling plays a role in maintaining the multipotency and proliferative capacity of NPCs, we used  $\gamma$ -secretase inhibitors (GSIs) to dampen Notch signaling in human iPSC-derived NPCs prior to transplantation and examined the effects on the growth of proliferative grafts. Histological analyses performed 8 weeks post-transplantation showed that briefly treating the donor population with GSIs not only reduced the graft volume but also altered the composition of the graft; control grafts showed neural overgrowth with numerous PAX6<sup>+</sup> and Ki 67<sup>+</sup> neural rosettes, whereas GSI-treated samples developed into mature neuronal grafts containing primarily Tubβ 3<sup>+</sup> cells. These results suggest that pretreating potentially proliferative progenitors with GSIs may improve the safety of cell replacement therapies using pluripotent stem cells.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Motono M, Sasai Y, Saiki H, Gomi M, Yoshikawa T, Hayashi H, Shinoyama M, Mohamed R, Suemori H, Miyamoto S, Takahashi J. : Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells

- in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 30 : 935-945 (2012)
- Ogura A, Morizane A, Nakajima Y, Miyamoto S, Takahashi J.:  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Prevent Overgrowth of Transplanted Neural Progenitors Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells *Stem Cells Dev.* Sep 28(E-pub) (2012)
- Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MCN, Gage FH, Yamanaka S, Inoue H.: Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med.* 4 : 145-104 (2012)
- Gomi M, Takagi Y, Morizane A, Doi D, Nishimura M, Miyamoto S, Takahashi J.: Functional recovery of the murine brain ischemia model using human induced pluripotent stem cell-derived telencephalic progenitors. *Brain Res.* 1459 : 52-60 (2012)
- Fujimoto M, Hayashi H, Takagi Y, Hayase M, Marumo T, Gomi M, Nishimura M, Kataoka H, Takahashi J, Hashimoto N, Nozaki K, Miyamoto S.: Transplantation of telencephalic neural progenitors induced from embryonic stem cells into subacute phase of focal cerebral ischemia. *Lab Invest.* 92 : 522-531 (2012)
- Shinoyama M, Ideguchi M, Hayashi H, Doi D, Hashimoto N, Suzuki M, Takahashi J.: CTLA4-Ig promotes neuronal differentiation in the grafts of embryonic stem cell-derived neural precursor cells. *Neuroscience* 202 : 484-491 (2012)
- Kitamura A, Fujita Y, Oishi N, Kalaria RN, Washida K, Maki T, Okamoto Y, Hase Y, Yamada M, Takahashi J, Ito H, Tomimoto H, Fukuyama H, Takahashi R, Ihara M.: Selective white matter abnormalities in a novel rat model of vascular dementia. *Neurobiol Aging.* 33 (5): 1012.e25-35 (2012)
- Nishimura K, Takahashi J.: Therapeutic application of stem cell technology towards the treatment of Parkinson's disease. *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

## 2) 総 説

- 森実飛鳥, 高橋 淳: パーキンソン病に対する iPS 細胞技術の挑戦 *BRAIN and NERVE* 64(1): 29-37 (2012)
- 森実飛鳥, 土井大輔, 菊地哲広, 斎木英資, 川崎俊之, 林 拓也, 尾上浩隆, 高橋 淳: ヒト ES 細胞を用いたパーキンソン病の細胞移植治療 *脳* 21 Vol.15 No.3 (2012)
- 土井大輔, 高橋 淳: 霊長類パーキンソン病モデルに対する ES 細胞による細胞移植治療医学のあゆみ *Vol.243 No.6*: 541-542 (2012)
- 西村周泰, 高橋 淳: iPS 細胞を用いたパーキンソン病に対する再生医療の現状と課題 *実験医学増刊号 Vol.30 No.10*: 150-156 (1659-1664) (2012)
- 元野 誠, 高橋 淳: パーキンソン病治療に向けた多能性幹細胞由来ドパミン神経細胞移植による前臨床研究 *遺伝子医学 MOOK* 22 号, 93-97 (2012)



◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Nishimura K, Takahashi J. Which state of host brain environment is suitable for cell transplantation therapy for Parkinson's disease? -Toward the optimization of host brain environment for cell transplantation therapy-. The 1st CiRA Retreat (2012.2.24. 滋賀)

森実飛鳥, 土井大輔, 菊地哲広, 斎木英資, 川崎俊之, 林 拓也, 尾上浩隆, 高橋 淳: ヒト ES 細胞を用いたパーキンソン病の細胞移植治療 カテコーラミン研究会 (2012.05.12. 東京)

土井大輔, 菊地哲広, 森実飛鳥, 高橋 淳: 臨床応用のためのヒト多能性幹細胞由来のドーパミン神経細胞純化方法の検討 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.06.12. 横浜)

菊地哲広, 森実飛鳥, 土井大輔, 井上治久, 沖田圭介, 高橋 淳: パーキンソン病患者由来 iPSC からのドーパミン神経誘導 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.06.13. 横浜)

Doi D, Kikuchi T, Morizane A, Takahashi J.: Sorting and transplantation of dopaminergic progenitor cells derived from human pluripotent stem cells. ISSCR 10th annual meeting (2012.06.14. 横浜)

Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Okita K, Inoue H, Takahashi J.: Induced pluripotent stem cells derived from idiopathic parkinson's disease patients differentiate into midbrain dopaminergic neurons. ISSCR 10th Annual meeting (2012.06.14. 横浜)

森実飛鳥: サル iPS 細胞による神経分化誘導: 自家移植モデルを目指して 第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.06.14. 横浜)

Motono M, Samata B, Takahashi J.: Analysis of glast sorted cells derived from ES/iPS cells for application of cell therapy. ISSCR 10th Annual Meeting (2012.06.15. 横浜)

Morizane A, Okita K, Doi D, Kikuchi T, Takahashi J.: Differentiation from primate induced pluripotent stem cells designed for an auto-grafting model system. ISSCR 10th Annual Meeting (2012.06.15. 横浜)

西村周泰, 高橋 淳: iPS 細胞を用いた脳内移植治療に対する生着向上因子の同定に向けてーホスト脳環境の分子基盤評価に基づいてー。ブレインバンクセミナー (2012.08.21. 東京)

西村周泰, 高橋 淳: iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞移植における生着向上因子の同定に向けて。第 35 回日本神経科学学会 (2012.9.19. 名古屋)

森実飛鳥: サル iPS 細胞由来神経の自家移植。日本脳神経外科学会第 71 回学術総会 (2012.10.17. 大阪)

土井大輔, 森実飛鳥, 高橋 淳: 霊長類パーキンソン病モデルにおけるヒト ES 細胞由来神経細胞の腫瘍源性と機能 第 15 回日本異種移植研究会 (2012.12.8. 京都)

Morizane A: Immune or inflammatory responses by allo- vs. auto-transplantation with primate iPS cell-derived neurons. NECTAR 22<sup>nd</sup> Annual Meeting (2012.11.30. Lund, Sweden)

Takahashi J: Sorting and transplantation of dopaminergic progenitor cells from human pluripotent stem cells. NECTAR 22<sup>nd</sup> Annual Meeting (2012.11.30. Lund, Sweden)

2) 講演・シンポジウム

高橋 淳: ES, iPS 細胞を用いた神経再生医療 第 3 回先進医療フォーラム大阪 (2012.01.21. 大阪)

高橋 淳: パーキンソン病に対する幹細胞移植治療の実現化に向けての前臨床研究 関西広域バイオメディカルク

ラスター成果報告会(2012.01.31. 大阪)

高橋 淳：パーキンソン病に対する多能性幹細胞移植研究 第2回神経再生医療研究会 in Sapporo(2012.02.08. 札幌)

高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植 医工学フォーラム－2011年度特別学術講演会(2012.02.22. 京都)

高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞治療のための開発研究 再生医療の実用化に関するニーズ発表会(2012.02.24. 神戸)

高橋 淳：ES, iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 Fujita脳神経外科友の会第5回市民フォーラム(2012.04.14. 名古屋)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 iPS細胞研究基金 感謝の集い(2012.05.14. 京都)

高橋 淳：再生医学は脳卒中を救えるか 市民公開講座 脳卒中にならない 脳卒中に負けない(2012.06.10. 京都)

高橋 淳：iPS/ES細胞を用いたパーキンソン病治療 第11回日本再生医療学会総会(2012.06.12. 横浜)

高橋 淳：iPS細胞技術と直接誘導法を用いた神経系の再生・疾患研究 文部科学省iPS細胞等研究ネットワーク第4回合同シンポジウム「再生医学研究の最前線」(2012.06.17. 横浜)

森実飛鳥：iPS細胞移植による治療の展望 神経変性疾患に関する調査研究班平成24年度ワークショップ(2012.07.20. 東京)

高橋 淳：ES,iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 NPOパーキンソン病支援センター平成24年度医療講演会(2012.07.22. 京都)

高橋 淳：Challenges towards stem cell therapy for Parkinson's disease 平成24年度包括型科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ(2012.07.25. 仙台)

高橋 淳：Induction and selection of iPSC-derived dopaminergic neurons for an effective transplantation against Parkinson's disease. The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry(2012.10.01. 神戸)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療の開発研究 CiRA Mini-Symposium -iPA細胞, 新しい医学への可能性－(2012.10.10. 京都)

高橋 淳：ES, iPS細胞を用いた, パーキンソン病に対する細胞移植治療日本脳神経外科学会第71回学術総会(2012.10.17. 大阪)

高橋 淳：ES, iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 第40回日本救急医学会総会・学術集会(2012.11.15. 京都)

## 組織再生応用分野 Department of Tissue Regeneration

分野主任 教授 戸口田 淳也

Prof. Junya Toguchida

### 【研究概要】

本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解することで、間葉系組織の臨床病態を分子レベルで明らかにし、それに基づいて新規の治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

#### 1. 間葉系幹細胞の増殖及び分化制御機構の解明

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell, MSC)が存在しているとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科学教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行ってきた。増殖制御機構に関しては、細胞周期制御因子である p16 遺伝子の発現亢進が細胞老化を誘導し、増殖停止をもたらす主因であることを報告した。続いて低酸素環境での培養により、p16 遺伝子の発現亢進が阻害でき、細胞老化に至ることなく、かつ分化能を維持したまま長期間増殖を継続できること、更に低酸素により ERK の活性が阻害され、それが p16 遺伝子の発現亢進阻害の一因であることを見出した。現在、低酸素環境による選択的細胞増殖の可能性に関して検討している。

#### 2. 間葉系幹細胞の肉腫起源細胞及び肉腫幹細胞としての意義について

癌の起源細胞が各組織に存在する組織幹細胞であることを示す報告が相次いでおり、MSC の場合、間葉系組織由来の腫瘍、すなわち肉腫の起源細胞になりうる。同時に MSC は、造腫瘍能が高く、化学療法に対して抵抗性である肉腫幹細胞の起源細胞ともなりうる。言い換えれば、肉腫幹細胞で特異的に発現しているマーカーは、MSC を同定するマーカーとなる可能性がある。そこで我々は現在、肉腫の代表的なものである骨肉腫と MSC の両方で発現している遺伝子である p75NGFR に注目し、これを指標として MSC と骨肉腫幹細胞の関連性を解析している。

#### 3. MSC を用いた骨壊死病態に対する新規治療法の臨床応用

MSC を用いた再生医療の実践として、骨壊死病変に対する細胞移植治療法の開発に取り組んでいる。イヌを用いた基礎実験のデータに基づき、京都大学医学部附属病院内の分子細胞治療センターを使用する臨床治験を「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に基づいた臨床研究として京都大学医学部医の倫理委員会及び厚生労働大臣諮問委員会に申請し、平成 19 年 11 月 25 日国内初の承認を受けた。平成 20 年 2 月 5 日に第一例の治療を開始し、平成 21 年 12 月末までに 15 例の治療を施行した。大腿骨頭壊死症例 10 例に関しては全例術後 2 年経過時点の評価が終了し、良好な成績が得られており、その結果に基づいて、先進医療への申請を計画している。

#### 4. 骨軟骨再生に対するプロスタノイド受容体作動性物質の応用

細胞を用いた再生医療と同時に、薬剤等による *in situ* での組織再生の探求も重要な課題である。我々は生理活性物質であるプロスタノイドに注目し、その受容体特異的作動薬の応用を検討してきた。プロスタグランジン E2 受容体の中の EP2 受容体に特異的に作用するアゴニストにより、軟骨細胞の増殖が促進されることを報告し、この知見に基づいて家兎を用いた *in vivo* 治療実験を行った。まず骨軟骨欠損を作成し、修復過程に対する EP2 アゴニストの作用を検討した。その結果、関節軟骨の修復が促進され、かつ正常な骨軟骨境界構造が構築され、長期に渡り関節構造が維持されることを見出した。続いて前十字靱帯切離及び内側半月板部分切除による外傷変性モデルを作成し、直後より EP2 アゴニストを投与し、投与量依存性に変性が軽減されることが判明した。免疫組織学的解析及び *in vitro* 培養系での実験結果より、この変性予防作用は MMP-13 産生の抑制を介した作用であると想定された。これらの結果に基づき、現在 Drug Delivery System を繰返し投与が可能となるように改変し、外傷性モデルによる解析を行っており、有望な結果が得られており、臨床応用が期待できる薬物であると考えている。

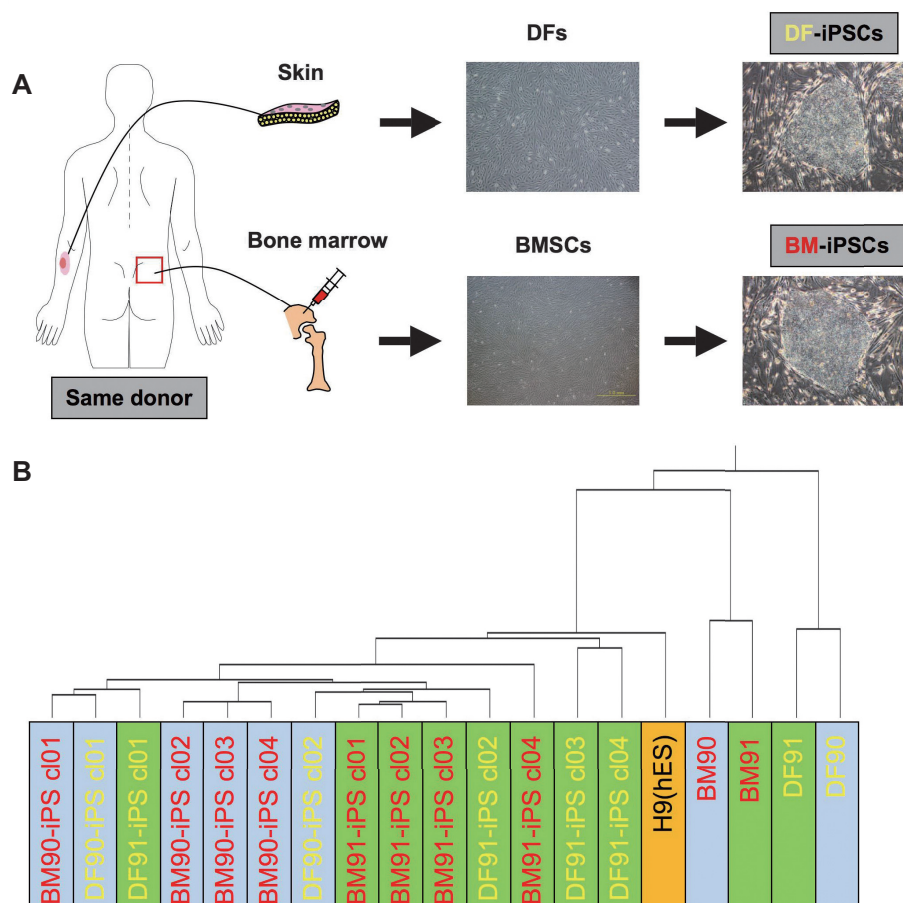


図 1 同一ドナーの異なる組織由来の iPSC 細胞の解析。A. 樹立模式図。同一ドナーより皮膚及び骨髓液を採取し、それぞれ皮膚線維芽細胞 (Dermal fibroblast, DF) 及び骨髓間質細胞 (Bone marrow stromal cell, BMSC) を単離培養、その後それぞれを iPSC 細胞とした。B. 樹立した iPSC 細胞クローンのクラスター解析。未分化状態における遺伝子発現プロファイルからドナー 90 (水色) とドナー 91 (緑色) 由来のクローンを分類した。DF 由来クローン (黄色文字) と BMSC 由来クローン (赤文字) はドナー毎に分類され、由来組織毎のクラスターは形成されなかった。

**Figure 1** Molecular analyses of iPSC clones derived from different tissues of an identical donor. A. Process of establishment. Skin and bone marrow were taken from a same donor, and dermal fibroblasts (DF) and bone marrow stromal cells (BMSC) were established from each tissue. Then, iPSCs were created from each type of cells. B. Cluster analyses of iPSC clones. Expression profiles of iPSC clones derived from donor 90 (blue box) and 91 (green box) were analyzed at undifferentiated state. DF-derived clones (yellow letter) and BMSC-derived clones (red letter) were classified based on the origin of donor, not by the origin of tissue.

## 5. iPS 細胞を用いたアプローチによる研究

平成 19 年 11 月に山中伸弥教授らによって樹立されたヒト iPS 細胞は、自家多能性幹細胞を用いた再生医療を可能とする画期的な細胞である。我々は平成 22 年 4 月 1 日に設立された京都大学 iPS 細胞研究所の一員として、iPS 細胞に関する研究を行っている。これまでに iPS 細胞のクローン間での間葉系への分化能の相違は、由来する組織に依存するのではなく、ドナー間での相違による事を明らかにした(図 1)。現在は骨軟骨関連難治性疾患患者から樹立された iPS 細胞を用いた病態解明と創薬を目指した研究を行っている。

(文責 戸口田淳也)

The objectives of our department are to disclose the pathology of disorders in mesenchymal tissues at molecular level and to develop new therapeutic modalities by understanding physiological growth and differentiation of mesenchymal cells. Following projects are currently undertaken.

### 1. Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells(MSC), which exist in bone marrow stromal tissues, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. However, many fundamental features of, are still unknown, which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence based medicine. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs. As for the growth regulation, we found that increased expression of the p16 gene, which is a key regulator of cell cycle, was the main cause inducing the senescence and growth arrest of MSC. We also found that the hypoxic culture condition inhibited the upregulation of the p16 gene, and retained MSCs in the senescence-free state with multidirectional differentiation properties. We also found that hypoxia down-regulated the activity of ERK, which, at least in part, involved in the down-regulation of the p16 gene. We are currently investigating whether hypoxic culture can select particular types of cells.

### 2. MSC as cell-of-origin and tumor-initiating cells of sarcomas

A number of recent reports suggest that cancer cells are derived from stem cells in each tissue. Therefore MSC can be cell-of-origin of sarcomas, which are malignant tumors developing in mesenchymal tissues. Also MSC can be tumor-initiating cells of sarcomas, which are highly tumorigenic and resistant to chemotherapeutic drugs. In other words, markers for sarcoma initiating cells can be used to identify MSC among stromal cells. We are currently focusing of p75NGFR, which is expressed on both MSC and osteosarcoma, a representative sarcoma derived from bone marrow stromal cells.

### 3. Clinical trial of the new treatment for osteonecrosis using MSC.

As the clinical application of MSC, we have engaged in the development of cell transplantation therapy for osteonecrosis. Based on the results obtained by the animal experiments using dogs, we established the protocol for the clinical trial in collaboration with Center for Cellular and Molecular Therapy in Kyoto University Hospital, which followed the guideline for the clinical trial using somatic stem cells issued by the the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW). After the examination of ethical committee of Kyoto University and MHLW, our proto



col was approved on November 25, 2007, and the first case was registered on November 31, 2007. Since then 15 cases have been treated until the end of December 2010. All of 10 cases of femoral head necrosis were followed at least 24 months, showing satisfactory results. Based on the data of this intermediate evaluation, we are going to submit this method as an advanced therapy for MHLW.

#### 4. Application of agonist for the PGE2 receptors for the articular cartilage repair

In addition to the development of cell therapy, it is also important to develop the *in situ* treatment using drugs or small molecular materials. We have focused on prostanoids, which belong to physiological active materials, and applied receptor agonists for the regeneration therapy. First we focused on EP2, which is one of four types of prostaglandin E2 receptor, and reported that the agonist specific to EP2 stimulated the growth of mouse and human chondrocytes extracted from articular cartilage. Based on these results, we have performed the *in vivo* experiments using rabbits. At first, we created the osteochondral defects and investigated the effect of EP2 agonist for tissue regeneration. As a result, in combination with appropriate drug carriers, EP2 agonist enhanced the cartilage regeneration *in vivo*, and contributed to reconstruct the osteo-chondral boundary, which is important factor to maintain normal structure of articular cartilage. Next, we created traumatic degeneration model by the dissection of anterior cruciate ligament and partial resection of medial meniscus and found that administration of EP2 agonist prevented the degeneration of articular cartilage dose-dependently. Immunohistochemical analyses and *in vitro* experiments suggested that the preventive effect of EP2 agonist is through the inhibition of MMP-13 expression, which is one of major protease to break cartilage matrix. Based on these results, we created new drug delivery system which allows repetitious administration and now are investigating the effect for traumatic degeneration model. Preliminary results suggested that this receptor-specific agonist is a promising molecule for clinical application.

#### 5. Research related to iPS cells

Human iPS cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007, are pluripotent stem cells enabling the regenerative medicine using patients' own cells. We have been engaging the research related to iPS cells as members in the Center for iPS Research and Application, Kyoto University, which was established on April 1, 2010. First project was to find whether the cell-of-origin of iPS cells affects their characteristics using genetically matched iPS cells established from different tissues of same donors. We found that characteristics of iPS depend on donors but not on the type of original somatic tissues. Current theme is to investigate the pathology and to develop new therapeutic drugs for intractable bone and cartilage diseases using patients-derived iPS cells.

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

Toguchida J. Regenerative medicine for bone diseases using mesenchymal stem cell. *Inflammation and Regeneration*, in press.

Nasu A, Ikeya M, Yamamoto T, Watanabe A, Jin Y, Matsumoto Y, Hayakawa K, Amano N, Sato S, Osafune K,

- Aoyama T, Nakamura T, Kato T, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells reveal that propensity for cartilage and bone differentiation differs with clones, not cell type of origin. PLoS One, in press
- Hayakawa K, Ikeya M, Fukuta M, Woltjen K, Tamaki S, Takahara N, Kato T Jr, Sato S, Otsuka T, Toguchida J. Identification of target genes of synovial sarcoma-associated fusion oncoprotein using human pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun, in press.
- Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida T, Shimizu K, Hara A, Yamada Y. EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. J Clin Invest, in press.
- Kajita Y, Kato T Jr, Tamaki S, Furu M, Takahashi R, Nagayama S, Aoyama T, Nishiyama H, Nakamura E, Katagiri T, Nakamura Y, Ogawa O, Toguchida J. The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). PLoS One, 2013; 8(1): e49709.
- Kajiwara M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, Endo H, Eto K, Toguchida J, Uemoto S, Yamanaka S. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012; 109(31): 12538-43.
- Kawaguchi S, Tsukahara T, Ida K, Kimura S, Murase M, Kano M, Emori M, Nagoya S, Kaya M, Torigoe T, Ueda E, Takahashi A, Ishii T, Tatezaki SI, Toguchida J, Tsuchiya H, Osanai T, Sugita T, Sugiura H, Ieguchi M, Ihara K, Hamada KI, Kakizaki H, Morii T, Yasuda T, Tanizawa T, Ogose A, Yabe H, Yamashita T, Sato N, Wada T. SYT-SSX breakpoint peptide vaccines in patients with synovial sarcoma: A study from the Japanese Musculoskeletal Oncology Group. Cancer Sci, 2012; 103(9): 1625-30.
- Masago Y, Hosoya A, Kawasaki K, Kawano S, Nasu A, Toguchida J, Fujita K, Nakamura H, Kondoh G, Nagata K. Molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. J Cell Sci, 2012; 125 (Pt5): 1118-28.
- 松本佳久, 池谷 真, 戸口田淳也. 難治性骨軟骨疾患罹患者由来 iPS 細胞を用いた病態再現と治療薬開発の試み. 遺伝子医学 MOOK22 最新疾患モデルと病態解明, 創薬応用研究, 細胞医薬創製研究の最前線 190-194.

## 2) 著 書

- 遺伝子医学 MOOK22 最新疾患モデルと病態解明, 創薬応用研究, 細胞医薬創製研究の最前線. 戸口田淳也, 池谷 真編, メディカルドゥ, 東京, 2012

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- 戸口田淳也. Identification of AFAP1L1 as a prognostic marker for spindle cell sarcoma. 第38回近畿肉腫研究会 (2012.1.14. 京都)
- 戸口田淳也, 青山朋樹, 根尾昌志, 前川 平. 骨髄間葉系幹細胞を用いた大腿骨頭壊死に対する新規治療法の開発. 第3回日本臨床試験研究会 (2012.2.24. 福岡)
- 中山富貴, 仲俣岳晴, 岡本 健, 戸口田淳也, 坪山直生. 年少小児大腿骨骨肉腫に対する伸長型人工関節の問題点.

第 85 回日本整形外科学会学術総会(2012.5.17. 京都)

福田 誠, 早川和男, 玉置さくら, 佐藤信吾, 池谷 真, 大塚隆信, ウォルテンクヌート, 戸口田淳也. 薬剤誘導型発現ベクターを用いた SYT-SSX 融合遺伝子導入 iPS 細胞の樹立. 第 11 回日本再生医療学会(2012.6.12. 横浜)

松本佳久, 池谷 真, Edward Hsiao, Christopher Schlieve, 那須 輝, 浅香 勲, 大塚隆信, Bruce Conklin, 戸口田淳也. iPS 細胞を用いた難治性骨疾患への取り組み. 第 11 回日本再生医療学会(2012.6.13. 横浜)

横山宏司, 池谷 真, 那須 輝, 田中孝之, 斎藤 潤, 梅田雄嗣, 西小森隆太, 中畑龍俊, 平家俊男, 戸口田淳也. iPS 細胞を用いた CINCA 症候群の関節病変の解析. 第 11 回日本再生医療学会(2012.6.13. 横浜)

那須 輝, 加藤友久, 山本拓也, 中村孝志, 池谷 真, 戸口田淳也. 同一ドナーの異なる組織より樹立した iPS 細胞の比較検討. 第 11 回日本再生医療学会(2012.6.13. 横浜)

早川和男, 加藤友久, 那須 輝, 池谷 真, 堀田秋津, 大塚隆信, 戸口田淳也. Generation of canine iPS cells and their characteristics. 第 11 回日本再生医療学会(2012.6.13. 横浜)

Hayashi Y, Hsiao E, Sami S, Lancero M, Schlieve C, Yano K, Nagahashi A, Ikeya M, Matsumoto Y, Asaka I, JToguchida J, Conckin B, Yamanaka S. BMP-SMAD-ID axis promotes reprogramming to pluripotency. 第 10 回 ISSCR(2012.6.14. 横浜)

Fukuta M, Hayakawa K, Tamaki S, Sato S, Ikeya M, Otsuka Y, Woltjen K, Toguchida J. Establishment and functional analysis of iPS cells with drug-inducible SYT-SSX fusion gene. 第 10 回 ISSCR(2012.6.14. 横浜)

Matsumoto Y, Ikeya M, Hsiao E, Schlieve C, Nasu A, Asaka I, Otsuka T, Conklin B, Toguchida J. Application of iPS cells to the research of fibrodysplasia ossificans progressiva. 第 10 回 ISSCR(2012.6.15. 横浜)

Yokoyama K, Ikeya M, Nasu A, Tanaka T, Saito M, Umeda K, Nishikomori R, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Understanding the pathology of the arthropathy in chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome by using iPS cells technology. 第 10 回 ISSCR(2012.6.15. 横浜)

Nasu A, Kato T, Yamamoto T, Ikeya M, Toguchida J. Genetically matched human iPS cells revealed that the propensity for iPS cells to differentiate into cartilage lineage cells differs with clones, but not cell type of origin. 第 10 回 ISSCR(2012.6.15. 横浜)

Watanabe M, Nasu A, Kato T, Ikeya M, Toguchida J, Sato T. Proteomic analysis-based identification of proteins related to differentiation of human iPS cells into cartilage cells. 第 10 回 ISSCR(2012.6.15. 横浜)

Schlieve C, Matsumoto Y, Hayashi Y, Kim H, Nguyen T, Sami S, Yamanaka S, Ikeya M, Toguchida J, Conklin B, Hsiao E. Modeling inherited skeletal disease in human iPS cells. 10th ISSCR(2012.6.15. 横浜)

玉置さくら, 加藤友久, 早川和男, 福田 誠, 高原直子, 梶田洋一郎, 戸口田淳也. 滑膜肉腫の発生機構に関して. 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2012.7.14. 東京)

岡本 健, 仲俣岳晴, 戸口田淳也. 当科における軟骨肉腫の長期成績. 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2012.7.15. 東京)

早川和男, 福田 誠, 玉置さくら, 佐藤信吾, 池谷 真, 大塚隆信, Knut Woltjen, 戸口田淳也. 薬剤誘導型発現ベクターを用いた SYT-SSX 融合遺伝子導入 iPS 細胞の樹立. 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2012.7.15. 東京)

沖田祐介, 立松典篤, 永井宏達, 中山富貴, 仲俣岳晴, 岡本 健, 戸口田淳也, 市橋則明, 坪山直生. 腫瘍用人工膝関節置換術後患者の歩行様式と膝関節機能の関連. 第 45 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会

(2012.7.15. 東京)

岡本 健, 仲俣岳晴, 戸口田淳也. 大腿骨転移性骨腫瘍に対する手術成績－髄内固定と切除置換の比較検討. －第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2012.7.15. 東京)

戸口田淳也, 玉置さくら, 早川和男, 福田 誠, 高原直子, 池谷 真, 加藤友久. 肉腫の病態解明への幹細胞研究の応用. 第71回日本癌学会総会(2012.9.21. 札幌)

長山 聡, 高橋 亮, 井元清哉, 布留守敏, 梶田洋一郎, 片桐豊雅, 中村祐輔, 坂井義治, 戸口田淳也. 大腸癌進展に關与する新規遺伝子の機能解析. 第71回日本癌学会総会(2012.9.21. 札幌)

森實一晃, 仲俣岳晴, 岡本 健, 戸口田淳也, 坪山直生, 松田秀一. 右下肢に多発した Glomus 腫瘍の1例. 第119回中部日本整形外科学会災害外科学会(2012.10.5. 福井)

早川和男, 加藤友久, 那須 輝, 池谷 真, 堀田秋津, 大塚隆信, 戸口田淳也. イヌ体細胞由来人工多能性幹細胞の樹立. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26. 名古屋)

横山宏司, 池谷 真, 那須 輝, 田中孝之, 斎藤 潤, 梅田雄嗣, 西小森隆太, 中畑龍俊, 平家俊男, 戸口田淳也. 罹患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節病態の分子機構の解明. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26. 名古屋)

松本佳久, 池谷 真, Edward Hsiao, 那須 輝, 浅香 勲, 大塚隆信, 戸口田淳也. 人工多能性幹細胞を用いた希少難治性骨疾患への取り組み. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26. 名古屋)

福田 誠, 早川和男, 玉置さくら, 沖田圭介, 池谷 真, Knut Woltjen, 大塚隆信, 戸口田淳也. PS 細胞を用いた肉腫研究: 滑膜肉腫の起源細胞の解明をめざして. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26. 名古屋)

小林恭介, 加藤友久, 玉置さくら, 高原直子, 戸口田淳也. 内軟骨性骨化における IkkB の機能解明. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.27. 名古屋)

岡本健, 仲俣岳晴, 中山富貴, 坪山直生, 戸口田淳也. 京都大学病院における骨転移カンサーボードの現状. 第1回骨転移マネジメントセミナー(2012.11.10. 京都)

Takahashi R, Kajita Y, Kato T, Furu M, Ikegawa M, Nagayama S, Sakai Y, Toguchida J. AFAP1L1 accelerates growth of sarcoma cells in vivo through the association with protein complex in invadopodia. 第17回 CTOS(2012.11.15. Prague)

Hayakawa K, Fukuta M, Tamai S, Kato T, Ikeya M, Otsuka T, Woltjen K, Toguchida J. Application of iPS cell technology for the analysis of origin-unknown sarcoma characterized by a specific fusion gene. 第17回 CTOS(2012.11.16. Prague)

Tamaki S, Kato T, Hayakawa K, Takahara N, Kajita Y, Toguchida J. Cell context is an important factor for the role of SYT-SSX on epigenetic regulation of transcription. 第17回 CTOS(2012.11.16. Prague)

玉置さくら, 加藤友久, 早川和男, 福田 誠, 高原直子, 梶田洋一郎, 戸口田淳也. 細胞背景は滑膜肉腫特異的融合蛋白質 SYT-SSX のエピゲノム制御において重要な因子である. 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.12. 福岡)

加藤友久, 渡辺 真, 佐藤孝明, 戸口田淳也. 滑膜肉腫特異的融合がん遺伝子 SYT-SSX によるエピジェネティック制御破綻の分子基盤の解明. 第35回日本分子生物学会年会(2012.12.12. 福岡)

## 2) 講演・シンポジウム

- 戸口田淳也. 幹細胞を用いた再生医療－間葉系幹細胞と iPS 細胞. 第 1 回山口大学再生医療フォーラム(2012.1.25. 宇部)
- 戸口田淳也. 低分子化合物を用いた軟骨再生治療について. 医工学フォーラム 2011 年度特別学術講演会(2012.2.22. 京都)
- 戸口田淳也. 整形外科領域における幹細胞研究の展開. 第 52 回関東整形災害外科学会(2012.3.23. 横浜)
- 戸口田淳也. 骨軟骨疾患への iPS 細胞技術の応用. 武田薬品湘南研究所講演(2012.4.11. 藤沢)
- 戸口田淳也. 細胞を用いた再生医療の現状と展望. 第 38 回整形外科カレントコンセプト(2012.4.21. 東京)
- 戸口田淳也. 運動器病態に対する再生医療の応用. 第 85 回日本整形外科学会学術総会(2012.5.18. 京都)
- 戸口田淳也. 幹細胞の医療応用：病態解明・創薬・細胞治療. 第 3 回平成 24 年度再生医療サポートビジネス懇話会(2012.7.31. 京都)
- 戸口田淳也. iPS 細胞研究の現況と展望. 第 11 回 MU ビジネスセミナー(2012.8.23. 大阪)
- Toguchida J. Prosepects of stem cell therapy in the musculoskeletal filed. Seminar in Musculoskeletal Research Cluster of the The Catholic Institute of Cell Therapy and Department of Orthopeic Surgery(2012.9.14. Seoul)
- Toguchida J. Application of somatic and pluripotent stem cells for musculoskeletal diseases. 第 9 回 The Catholic International Stem Cell Symposium(2012.9.15. Seoul)
- 戸口田淳也. 骨・軟骨疾患への幹細胞研究の応用：現況と展望. 第 16 回長崎障害者支援再生医療研究会(2012.9.25. 長崎)
- 戸口田淳也. 悪性軟部腫瘍の診断・治療：現況と展望. 第 74 回比叡山画像カンファレンス(2012.10.18. 京都)
- 戸口田淳也. iPS 細胞研究の現況と展望. 第 1417 回京都ライオンズ例会(2012.10.24. 京都)
- 戸口田淳也. 骨・軟部腫瘍に関する基礎研究の現況. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.27. 名古屋)
- Toguchida J. Application of iPS cell technology for bone and cartilage diseases. 第 2 回 UK Cartilage Club Meeting (2012.11.4. Kent)
- 戸口田淳也. iPS 細胞研究の現況と展望. 国際ロータリー第 2660 地区 2012-13 年度地区大会(2012.12.8. 大阪)



## 器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

准教授 角 昭一郎

Assistant Prof. Shoichiro Sumi

### 【研究概要】

本分野では、糖尿病の再生医療を中心的な研究テーマとしており、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。具体的な研究内容としては、長年研究を続けているバイオ人工膵島の実用化に向けた研究、各種の幹細胞等を用いた新しい糖尿病治療用細胞資源の探索、および、これらの作成に不可欠な周辺技術の研究開発である。

重症の糖尿病で、インスリン補充療法による血糖コントロールが困難な場合、膵臓や膵島の移植が適応となる。しかし、ドナー不足と永続的な免疫抑制という移植医療に共通の問題は避けられず、いつでも受けられる安全な治療法という理想からは大きな隔たりがある。また、低侵襲の移植医療として大きな期待を担ってきた膵島移植は、長期的な有効性に疑問が持たれるなどなお解決されるべき問題が多い。このような状況の中、糖尿病の再生医療には大きな期待が寄せられている。

膵島再生医療を実現する道筋としては、最も直接的に自己の膵島再生を促進する方法、自己または他者に由来する組織幹細胞あるいはES(胚性幹)細胞やiPS(人工多能性幹)細胞から膵島様細胞を分化誘導する方法、さらに、ヒト以外の異種動物の膵島を分離して利用する方法などが研究されている。しかし、自己由来の細胞ではなく、他者や異種の細胞を移植する場合には拒絶反応の対象となり、また、治療対象となる重症糖尿病の多くが自己免疫の関与する1型糖尿病であることを考慮すると、膵島や膵島様細胞を患者の免疫機構から保護する対策が必要である。本分野では、免疫隔離能を有する各種の半透膜やゲルで膵島や膵島様細胞を包んで拒絶反応を抑制することで、免疫抑制を行うことなく膵島移植と同等の治療効果が期待されるバイオ人工膵の研究を行っている。実際に、国外ではマイクロカプセル化ブタ膵島の腹腔内移植による糖尿病治療の臨床研究がすでに行われており、一定の成果をあげている。しかし、マイクロカプセル化膵島は一度移植すると完全に除去することが困難であり、この点で安全性に限界がある。

本分野では、ラットやブタの膵島分離法を確立し、これらを用いてマイクロカプセル化膵島の研究を行って来た。マイクロカプセル化膵島は、前述のマイクロカプセル化膵島とは対照的に、回収や交換が可能であり、臨床応用にはより有利と考えられる。過去には、メッシュ補強ポリビニルアルコール(PVA)バッグやポリスチレンスルホン酸混合アガロースゲルによるカプセル化など、各種のマクロデバイスの研究開発を行うとともに、あらかじめ血管誘導処置を施した皮下組織にこのようなデバイスを移植することで異種膵島による長期の血糖正常化が達成されることをマウス糖尿病モデルの治療実験で明らかにしてきた。近年では、イヌなど大型動物や最終的な目標であるヒトに応用可能な大型のバイオ人工膵を作製することをめざした新しい独自のバイオ人工膵作成技術として、膵島の凍結保存法と凍結によるPVAのゲル化を組み合わせた作製法を開発して、その有用性をマウスおよびラットの糖尿病モデルへの移植実験で確認している。即ち、膵島凍結保存液にPVAを溶解した粘性の高い溶液に膵島を浮遊させ、この液体をメッシュで補強してシート状に成形した後、凍結・溶解してゲル状のバイオ人工膵シートを作成する。この方法によれば、デバイスの面積や厚さを自由にコントロールすることが可能で、将来の大型化に大きく道を拓

くものと考えている。また、PVA マクロカプセル化膵島は凍結保存が可能で、この点では、輸送・蓄積・品質管理などに対応できるという臨床応用に適した大きな利点を有している。

糖尿病治療用細胞資源探索の分野では、本年は、国立がん研究センターの大木理恵子研究員らとの共同研究で、膵内分泌腫瘍等で高頻度に機能低下が見られる新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制による膵島細胞の脆弱性改善・移植効果増強の研究を開始し、当該遺伝子の knock-down や knock-out マウスの分離膵島などを用いて有望な結果を得つつある。また、マウス ES 細胞から  $\beta$  細胞を効率的に分化誘導する研究では、分化初期の definitive endoderm 誘導における activin の役割を研究し、成果の一部を学会発表した。一方、我々はすでに、マウス  $\beta$  細胞株である MIN6 細胞で、細胞塊を形成させることにより膵島特異的な遺伝子発現が増強し、より生理的なブドウ糖－インスリン分泌反応曲線およびインスリン分泌反応の迅速化が実現することを示しているが、本年は、この機能向上が移植効果の向上に繋がるか否かを検討する実験を行う基礎的技術として、細胞塊作成用新規培養面の開発研究に新たに着手した。また、我々は、脆弱で増殖能が乏しい膵島細胞と高い増殖能を有する間葉系幹細胞とを細胞融合させることで、より糖尿病治療に適した細胞を作製する研究に取り組んできたが、融合細胞が *in vitro* で長期にインスリン分泌能を維持するとともに移植効果も良好であるとの結果を得て、論文化に取り組んでいる。今後はこのような細胞の PVA マクロカプセル化による糖尿病治療を目指して研究を展開する予定である。

これらの研究と並行して、バイオ人工膵の研究では、東北大学・後藤昌史教授・坂田直昭助手らと共同で、ヒト膵島の PVA マクロカプセル化による臨床応用や、ブタ膵島の PVA マクロカプセル化によるペット動物の糖尿病治療等への応用を視野に入れて、臨床応用に適した作成法の確立、作成機材の研究等を進めている。

Our final goal is to establish regenerative medicine for diabetes mellitus, which should be a safe and effective therapy available whenever and wherever required for a growing number of diabetes patients world-wide. Major fields of our research are studies on bioartificial pancreas toward clinical application, search for novel cell sources applicable to diabetes therapy utilizing wide range of cells including various stem cells, and developmental research upon technologies to accomplish these studies.

In severely diabetic patients, pancreas or islet transplantation is indicated, if good control of blood glucose levels is not available. However, donor shortage and complications due to immunosuppressive therapy are inevitable problems of allo-transplantation. In addition, islet transplantation that drew attention as a promising curable treatment has become less attractive because of rather a short duration of insulin-free period after transplantation. Therefore, current transplantation therapies are still far from our dream. In such circumstances, much expectations are placed on regenerative medicine for diabetes mellitus.

In order to develop regenerative medicine for diabetes mellitus, there are several different approaches such as enhancement of patient's own islet regeneration, auto- or allo-geneic islet-like cells differentiated from somatic, embryonic or induced pluripotent stem cells *in vitro* and xeno-geneic islets isolated from the pancreas of animals e.g. pigs. However, as long as non-self cells are used and even autologous cells are used to type-1 diabetes that has autoimmune background, efficient immunosuppression should be required. In order to avoid it, we are diligently studying bio-artificial pancreas, in which islet cells are encapsulated by several kinds of semi-permeable membrane or hydrogel and thereby protected from host immune responses. In fact, clinical trial of micro-encapsulated porcine islets are ongoing in a few foreign countries, showing certain beneficial effects. However, micro-encapsulated islets do not allow complete retrieval, which may lower the safety level.

We have established isolation method of porcine pancreatic endocrine cells as well as rat islets. Using these islets, we have successfully shown the efficacy of several macro-devices of bio-artificial pancreas. In contrast to micro-encapsulation, macro-devices are retrievable and exchangeable, which is important advantage toward clinical application. In our past studies, mesh-reinforced polyvinyl alcohol (PVA) tube and bag, rod-shaped device of agarose containing polystyrene sulfonate, anti-complement substance, and so on were investigated in allo- and xeno-geneic situations. We have also shown that the subcutaneous site pretreated for angiogenesis can be successfully used for transplantation site of these devices, leading to long-term normalization of blood glucose levels in diabetic mice. Recently we developed a novel method to make a sheet-shaped PVA-macroencapsulated islets by a combination of the freezing technique of islets and the phenomenon that PVA solution becomes gel by freezing and thawing. Briefly, islets are suspended in islet freezing solution containing PVA and this viscous solution is molded into a mesh-reinforced sheet and then frozen. This method enables us to make a device of any size with any shape that may be applicable to bigger animals and humans. PVA-macroencapsulated islets are unique cryo-preservable bio-artificial pancreas that allows easy shipping, accumulation and quality-control of the device, which is suitable for clinical usage.

In the year 2012, we started a collaborative study with Dr. Rieko Ohki (National Cancer Center Research Institute) on the effect of knock-down of PHLDA3, a novel tumor-suppressor gene found in endocrine tumors of the pancreas and lung, on fragility and transplantation efficacy of islets. We also performed *in vitro* experiment in mouse ES cells and studied the roles of activin in early differentiation toward definitive endoderm and a part of this study was presented in an academic meeting. We have already found that formation of cell cluster of MIN6 cells enhances islet specific gene expression, more physiological glucose-insulin response curve and more rapid insulin release in response to glucose stimulation. In order to investigate the effects of cluster formation in transplantation, we started another study on the novel culture surface to develop high-throughput methods of cell cluster formation. We have established a method of cell fusion between islet cells and mesenchymal stem cells and obtained results suggesting that such cells show persistent insulin-release *in vitro* and more efficient after transplantation. This study is on the way to publication. These *in vitro* processed cells will be studied for the feasibility to be involved in PVA-macroencapsulate for diabetes therapy.

In addition, in collaboration with Professor Masashi Goto and Dr. Naoaki Sakata of Tohoku University, we are developing novel instruments and methods suitable to process PVA-macroencapsulated islets for clinical use with a view to clinical application of human islets and veterinary use of porcine islets.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Qi Z, Yamamoto C, Imori N, Kinukawa A, Yang KC, Yanai G, Ikenoue E, Shen Y, Shirouzu Y, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. *Cell Transplant*. **21** : 525-534, 2012.

Kai-Chiang Yang, Chang-Chin Wu, Shu-Hua Yang, Chien-Chang Chiu, Shoichiro Sumi, Hsuan-Shu Lee. Investigating the suspension culture on aggregation and function of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Biomedical*

Materials Research : Part A (in press)

Pei-Yu Chen, Chang-Chin Wu, Dai-Hua Lu, Shoichiro Sumi, Feng-Huei Lin, Kai-Chiang Yang. Microenvironment-regulated gene expression, morphology, and In vivo performance of mouse pancreatic  $\beta$ -cells. *Process Biochemistry* (in press)

## 2) 著書・総説等

Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu I, Goto M, Unno M. EDITORIAL: Encapsulated islets transplantation-past, present and future- *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* **3**: 19-26.

角 昭一郎. 細胞移植(膵島など). 遺伝子医学 MOOK 別冊「ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線-古くて新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)」(in press)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

白水泰昌, 角 昭一郎, 日裏彰人. Retinoic acid を用いたマウス胚性幹細胞からインスリン産生細胞の分化誘導. 第 10 回日本消化器外科学会大会(JDDW2012).(神戸市)10 月 10-13 日, 2012

Shoichiro Sumi, Yuanjun Gu, Meirigeng Qi, Naoaki Sakata, Zhi Qi, Yasumasa Shirouzu, Kaichiang Yang, Goichi Yanai, Akihito Hiura, Kazutomo Inoue. Studies on polyvinyl alcohol-macro-encapsulated islets for diabetes therapy. 9<sup>th</sup> International Diabetes Federation Western Pacific Region Congress and 4<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes.(2012.11.24-27. Kyoto)

Ota A, Matsumura K, Lee JJ, Okihara H, Hyon SH. Novel cryopreservation agent for effective vitrification of human embryonic stem cells using carboxylated  $\mu$ -poly-L-lysine. 10<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research.(2012.6.13-16. Yokohama)

Lee JJ, Ota A, Matsumura K, Mori H, Hyon SH. Cryopreservation for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood using carboxylated  $\epsilon$ -poly-lysine. 10<sup>th</sup> International Society for Stem Cell Research.(2012.6.13-16. Yokohama)

Ota A, Matsumura K, Sumi S, Hyon SH. Xeno-free cryopreservation agent containing  $\epsilon$ -poly-L-lysine derivative for human iPS cells by slow-freezing method. 第 35 回日本分子生物学会年会.(2012.12.11-14. 福岡市)

### 2) 講演・シンポジウム

角 昭一郎. 糖尿病再生医療の現状と展望. 医工学フォーラム 2011 年度特別学術講演会.(京都市)2 月 22 日, 2012.

Shoichiro Sumi, Yuanjun Gu, Meirigeng Qi, Naoaki Sakata, Qi Zhi, Yasumasa Shirouzu, Kaichiang Yang, Goichi Yanai, Akihito Hiura and Kazutomo Inoue. Islet xenotransplantation by PVA-macroencapsulation. 9<sup>th</sup> World Biomaterial Congress.(2012.6.1-5. Chhengdu, China)

Sumi S. Regenerative Medicine for Diabetes Mellitus and Bio-artificial Pancreas. 2<sup>nd</sup> International Symposium of Materials on Regenerative Medicine.(2012.8.29-31. Taipei, Taiwan)

Sumi S. Regenerative medicine for diabetes mellitus and bio-artificial pancreas. The Sixth International Conference on Cell Therapy.(Seoul, Korea) Oct. 26, 2012.

角 昭一郎. DM の再生医療とバイオ人工膵島. 美作医会.(2012.11.11. 津山市)

## 臓器再建応用分野 Department of Bioartificial Organs

准教授 中村 達雄

Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura

### 【研究概要】

臓器再建応用分野では、“*in situ* Tissue Engineering” の概念に基づいて再生医学を推進し、人類の幸福に貢献することを研究の第一目標にしています。これによって、未だ治療法がない症例や、或いは移植ドナー不足のため治療が受けられない患者さんが救われることを目指しています。さらに、再生医療が普及すると高騰を続けている医療費が抑制されることが期待されると考えています。

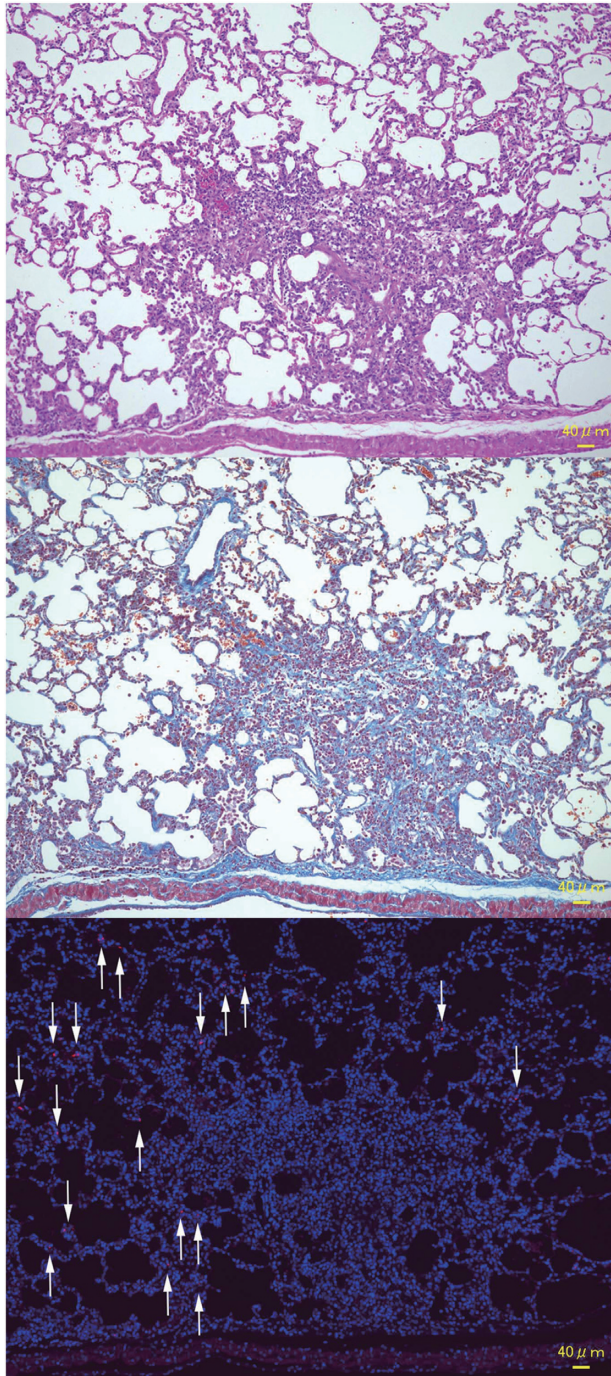
人間の体には、本来、再生能が備わっており、我々はそれらを引き出す新しい手法を開発しています。それが生体内再生 *in situ* Tissue Engineering です。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる適切な足場を体内に与えることによって、損傷を受けた自己の臓器が本来の構造と機能を再生出来るようにしています。研究の方法としては、再生医学の3つの柱である(1)足場、(2)細胞、(3)増殖・成長因子を生体内で働かせる生体内再生 “*in situ* Tissue Engineering” という手法を独自に開発し、それを進めています。具体的には、同種・異種の臓器や組織から酵素処理で免疫原性を完全になくしたコラーゲンを抽出し、それを用いて作製した細胞外マトリックスや、或いは組織から細胞を完全に除去することにより作製した細胞外基質、さらには生体内で分解吸収される合成高分子を用い、それらに増殖因子などを除放させる DDS(薬物送達システム)を組み合わせることによって、欠落した組織や臓器が再生する枠組みを生体内に作ります。この枠組みを『足場』とし、生体内の幹細胞が増殖、分化することにより、自己の組織や臓器が再生復元されます。また、これらと平行して、iPS細胞や脂肪由来幹細胞を樹立・増殖させて組織再生に用いる研究や、瘢痕状になった細胞外マトリックスを融かして再び本来の性状に戻す研究も進めています。

現在行っている研究対象は下記のように分類されます。

- ①角膜、心膜、胸膜、腹膜、脳硬膜などの膜系
- ②血管、気管、喉頭、消化管などの管状臓器
- ③外力の加わる組織(骨、永久歯、歯根膜)
- ④末梢神経
- ⑤脊髄・脳などの中枢神経系
- ⑥泌尿器系組織
- ⑦肺、腎臓、肝臓、甲状腺、上皮小体、脾臓などの実質性代謝臓器
- ⑧脂肪組織や筋肉組織、皮膚、その他軟組織
- ⑨人工臓器の開発や造影剤の研究
- ⑩手術器具・手術術式の研究
- ⑪バイオマテリアルの研究
- ⑫ロボット手術の研究

当分野の研究の根幹概念は、細胞が増殖、再分化して、元の臓器を復元させうる“場”(環境)を人工的に体の中





幹細胞、前駆細胞は分化増殖能をもつことから再生医学で注目されています。Adipose-derived stromal cell (ASC)は再生医療の分野で最も期待される細胞の一つです。現在有効な治療法のない呼吸器疾患に対する新たな治療法の開発を目標に、ブレオマイシン誘発性肺障害ラットモデルを使用しASCの再生能力を検討しています。

The upper panel shows the results of hematoxylin & eosin staining, middle panel shows the Masson's trichrome staining, and the lower panel shows the fluorescence. Nuclei were labeled with DAPI, and fluoresced blue. DiI-labeled ASCs (red fluorescence, indicated by arrows) surrounded the fibrotic tissue, but barely migrated into the scar, in which interstitium was thickened by fibrosis, and the alveolar architecture was distorted.

に作れば、哺乳動物の臓器や組織も両生類のイモリのように再生復元させることが出来るというメカニズムを医学に応用するものです。このような生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法であり、人工気管や人工神経などすでに臨床応用され、これによって救われる患者さんの数も着々と増えてきています。この新しい技術は21世紀の医療の中心的柱になるものと考えています。

*In situ* Tissue Engineering: We have devised a completely new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the cell component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Organs made of self-cells thus

regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood vessels with this method. A similar method is also ap-

plicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Further more, this new approach help to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

No study based on these concepts has ever been done either in Japan or abroad. In this sense, our pioneering work is expected to be a major area of medical science for the coming generation.

### Strategy and targets of our study

The target organs currently being considered for this development project are the heart, heart valves, esophagus, stomach, intestine, gallbladder, trachea, lung, liver, kidney, peripheral nerves, spinal cord, cornea, tendons, ligaments, cartilage, bone, fatty tissue, periodontal tissue, and permanent teeth. We plan to employ the two major methods as described below.

### ECM Method

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the living body as a temporary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors are should facilitate cell proliferation and cell redifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

### *in situ* Tissue Engineering and Field theory

Cells (or living tissues) of patients are complexed (mixed) with purified ECM or bioabsorbable material. Using this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell (MSC) obtained from the bone marrow is now applied to this method.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

中村達雄：肺に対する再生医療応用の可能性. 侵襲と免疫. **21**(2):7-12(2012)

Nakamura, T., Fumitsugu, K., Sato, T., Nakada, A., Wakatsuki, M., Sasauchi, K., Kida, N., Kanemaru, S., Omori, K., Kaneko, M., Shigeno, k., Inada, Y., Endo, K.: Artificial trachea and In situ tissue engineering: twelve gean-follow up.in canine model. Int Artif Organs. **35**(8): 608(2012)

Shimada, H., Hashimoto, Y., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. BBRC.

417: 659-664(2012)

Honda, M., Hori, Y., Shionoya, Y., Yamamoto, K., Kida, N., Kojima, F., Nakamura, T.: Fluid overload deteriorate the chylothorax. Disease of Esophagus. Diseases of the Esophagus. **25**: 269-272(2012)

Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Kitani, Y., Kojima, T., Ishikawa, S., Mizuta, M., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Transforming Growth Factor  $\beta$ 3 for the prevention of vocal fold scarring. Laryngoscope. **122**: 583-589 (2012)

Ohno, s., Hirano, S., Kanemaru, S., Kitani, Y., Kojima, T., Ishikawa, S., Mizuta, M., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Transforming Growth Factor  $\beta$ 3 for the prevention of vocal fold scarring. Laryngoscope. **122**(3):583-589 (2012)

Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Mizuta, M., Ishikawa, S., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Role of Circulating Mesenchymal Stem Cells in Vocal Fold Wound Healing. Laryngoscope. **122**(11):2503-2510(2012)

嶋 裕子, 喜田久美, 菅野和加子, 山西弘美, 石田宏美, 岩下恵子, 森田倫史, 諸井慶七郎, 中村達雄, 稲田有史: 血管穿刺時の神経損傷・神経障害の新概念による病態解明とその予防 1 疑いで病院を受診した当センター 10 症例の検討. 血液事業. **34**(4):591-594(2012)

嶋 裕子, 喜田久美, 菅野和加子, 山西弘美, 石田宏美, 岩下恵子, 森田倫史, 諸井慶七郎, 中村達雄, 稲田有史: 血管穿刺時の神経損傷・神経障害の新概念による病態解明とその予防 2 献血者における上肢の Subclinical な状態の出現頻度. 血液事業. **34**(4):573-577(2012)

Tani, A., Tada, Y., Takezawa, T., Imaizumi, M., Nomoto, Y., Nakamura, T., Omori, K.: Regeneration of Tracheal Epithelium Using a Collagen Vitrigel-Sponge Scaffold Containing Basic Fibroblast Growth Factor. Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology. **121**(4): 261-268(2012)

Tani A, Tada Y, Takezawa T, Wada I, Imaizumi M, Nomoto Y, Nomoto M, Omori K: Regenerative Process of Tracheal Epithelium Using a Collagen Vitrigel Sponge Scaffold. Laryngoscope, 2012(in press).

Tani A, Tada Y, Takezawa T, Imaizumi M, Nomoto Y, Nakamura T, Omori K: Regeneration of Tracheal Epithelium Using a Collagen Vitrigel-Sponge Scaffold Containing Basic Fibroblast Growth Factor. Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology, **121**(4): 261-268, 2012.

橋本典也, 島田英徳, 中田 顕, 茂野啓示, 松野智宣, 佐藤田鶴子, 中村達雄, 武田昭二: イヌ iPS 細胞を用いた歯周組織再生における細胞治療の基盤確立. 日本歯科医学会誌. **31**: 29-33(2012)

平野 滋, 金丸眞一, 中村達雄, 伊藤壽一: PGA チューブによる反回神経再建を施行した甲状腺癌長期経過の一例. 頭頸部癌. **38**(3): 363-367(2012)

Tatekawa, y., Nakada, A., Nakamura, T.: Intrahepatic biliary ablation with pure ethanol: an experimental model of biliary atresia. Surg Today. (2012)

中瀬有遠, 萩原明於, 中村達雄: in situ Tissue Engineering による人工食道の開発. G. I. Research. **20**(5):40-43 (2012)

萩原明於, 辻本洋行, 阪倉長平, 中村達雄: 消化器系における神経再生: 神経再生を用いる直腸癌の新しい手術戦略. G.I. Research. **20**(6): 48-55(2012)

稲田有史, 中村達雄: 慢性疼痛疾患(難治性慢性疼痛): CRPS(Complex regional pain syndrome: 複合性局所疼痛症候群)に対する生体内再生治療. Bone Joint Nerve. **2**(2): 333-338(2012)

稲田有史, 諸井慶七郎, 中村達雄, 森本 茂, 古家 仁: 神経障害性疼痛(Complex regional pain syndrome(CRPS))



- を含む)に対する生体内再生治療. 治療. **94(5)**: 1031-1038(2012)
- Shigeno, k., Nakada, A., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Hashimoto, Y., Inada, Y., Nakamura, T.: Regeneration of canine inferior alveolar nerve by polyglycolic acid-collagen tube. *Int Artif Organs*. **35(8)**: 569(2012)
- Kaneko, M., Wakatsuki, M., Shigeno, k., Nakada, A., Nakamura, T.: The experiment of the bone regeneration in the canine fronfale. *Int Artif Organs*. **35(8)**: 608(2012)
- Wakatsuki, M., Kaneko, M., Sasauchi, K., Nakada, A., Shigeno, k., Nakamura, T.: Promotion of bone repairing by use of novel Collagen scaffold in Rabbit skull defect model. *Int Artif Organs*. **35(8)**: 591(2012)
- Gugatschka, M., Ohno, S., Saxena, A., Hirano, S.: Regenerative Medicine of the Larynx. Where are we Today? A Review *J Voice*. **26(5)**: 670.e-7-13(2012)
- Ishikawa, S., Tateya, I., Hayakawa, T., Masaki, N., Takizawa, Y., Ohno, S., Kojima, T., Kitani, Y., Kitamura, M., Hirano, S., Setou, M., Ito, J.: Increased expression of phosphatidylcholine(16:0/18:1)and(16:0/18:2)in thyroid papillary cancer. *PLoS One*. **7(11)**: e48873(2012)
- 早川克己: 画像診断セーフティマネジメントー判断に迷う症例から学ぶ No.3 膝関節術後に発症した急性腹症の症例. *日本医師会雑誌*. **140(12)**: 2588-2589(2012)
- 早川克己: 画像診断セーフティマネジメントー判断に迷う症例から学ぶ No.4 急性腎盂腎炎が疑われた症例. *日本医師会雑誌*. **141(1)**: 104-105(2012)
- 早川克己: 年齢別特徴をふまえた脳神経画像診断ー小児から成人まで. 頭部外傷, 虐待. *画像診断*. **32(13)**: 1236-1251(2012)
- Hayakawa, K., Tanikake, M., Yoshida, S., Urata, Y., Inada, Y., Narumi, Y., Yamamoto, E., Morimoto, T.: Radiological diagnosis of large-bowel obstruction: nonneoplastic etiology. *Japanese Journal of Radiology (Jpn J Radiol)* **30**: 541-552(2012)
- Ogura, A., Hayakawa, K., Maeda, F., Saeki, F., Syukutani, A., Shibutani, S., Kuroda, E.: Differential diagnosis of vertebral compression fracture using in-phase / opposed-phase and short TI inversion recovery imaging. *Acta Radiologica* **53**: 450-455(2012)
- Mizuta, M., Hirano, S., Ohno, S., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J.: Expression of reactive oxygen species during wound healing of vocal folds in a rat model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* (in press)
- Imaizumi, M., Tada, Y., Okano, W., Tani, A., Omori, K.: Effectiveness of steroid injections for bamboo nodules: A case report. *Ear, Nose & Throat Journal*, 2012(in press).
- Imaizumi, M., Nomoto, Y., Sato, Y., Sugino, T., Miyake, M., Wada, I., Nakamura, T., Omori, K.: Evaluation of the use of Induced Pluripotent Stem Cells(iPSCs)for the Regeneration of Tracheal Cartilage. *Cell Transplantation*, 2012(in press).
- Imaizumi, M., Okano, W., Tada, Y., Omori, K.: Surgical treatment of laryngeal papillomatosis using narrow band imaging. *Otolaryngol Head Neck Surg*. **147(3)**: 522-524, 2012.
- Suzuki, M., Kawakita, D., Hanai, N., Hirakawa, H., Ozawa, T., Terada, A., Omori, K., Hasegawa, Y.: The contribution of neck dissection for residual neck disease after chemoradiotherapy in advanced oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma patients. *Int J Clin Oncol*, 2012(in press).
- Otsuki K, Imaizumi M, Nomoto Y, Wada I, Miyake M, Sugino T, Omori K: Potential for Respiratory Epithelium Regeneration From Induced Pluripotent Stem Cells. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 2012(in

- press).
- Nomoto M, Nomoto Y, Tada Y, Tani A, Otsuki K, Suzuki R, Nakamura T, Omori K: Bioengineered Trachea Using Autologous Chondrocytes for Regeneration of Tracheal Cartilage in a Rabbit Model. *Laryngoscope*, 2012(in press).
- Nomoto Y, Okano W, Imaizumi M, Tani A, Nomoto M, Omori K: Bioengineered prosthesis with allogenic heterotopic fibroblasts for cricoid regeneration. *Laryngoscope*, **122**(4): 805-809, 2012.
- Matsui T, Ogawa H, Yamada N, Baba Y, Suzuki Y, Nomoto M, Suzutani T, Inoue N, Omori K: Outcome of cochlear implantation in children with congenital cytomegalovirus infection or GJB2 mutation. *Acta Otolaryngol*, **132**(6): 597-602, 2012.
- Matsuzuka T, Takahashi K, Kawakita D, Kohno N, Nagafuji H, Yamauchi K, Suzuki M, Miura T, Furuya N, Yatabe Y, Matsuo K, Omori K, Hasegawa Y: Intraoperative Molecular Assessment for Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Using One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) Assay. *Ann Surg Oncol*, **19**: 3865-3870, 2012.
- 松塚 崇, 鈴木政博, 三浦智広, 横山秀二, 國井美羽, 西條 聡, 大森孝一: センチネルリンパ節生検. 頭頸部外科, **22**(2): 115-119, 2012.
- 松塚 崇, 大森孝一: Ménière 病. *Clinical Neuroscience*, **30**(1): 74-76, 2012.
- Shiga K, Ogawa T, Kobayashi T, Ueda S, Kondo A, Nanba A, Kuwashima S, Asada Y, Suzuki S, Nagahashi T, Takahashi M, Suzuki M, Ishida A, Watanabe K, Harabuchi Y, Himi T, Sinkawa H, Sato H, Saijo S, Fukuda S, Tanaka K, Ishikawa K, Omori K, Aoyagi M, Hashimoto S: Malignant melanoma of the head and neck: A multi-institutional retrospective analysis of cases in Northern Japan. *Head Neck*, **34**(11): 1537-1541, 2012.
- Tada Y, Takezawa T, Tani A, Nakamura T, Omori K: Collagen vitrigel scaffold for regenerative medicine of the trachea: Experimental study and quantitative evaluation. *Acta Otolaryngol*, **132**(4): 447-452, 2012.
- 松原 篤, 西澤尚徳, 新川秀一, 本田耕平, 石川和夫, 佐藤宏昭, 太田伸男, 鈴木祐輔, 青柳 優, 大島猛史, 中谷和宏, 小林俊光, 小川 洋, 三浦智広, 大森孝一: 通年性アレルギー性鼻炎に対するモメタゾン点鼻薬単独投与の効果－第2世代抗ヒスタミン薬投与で効果が不十分な症例での切り替え試験－. 耳鼻と臨床, **58**(2): 89-95, 2012.
- 大森孝一, 多田靖宏, 野本幸男, 谷亜希子, 金丸眞一, 中村達雄: 声門・声門下・気管狭窄の外来治療: 喉頭気管溝形成と気道再建を中心に. *日本気管食道科学会会報*, **63**(2): 124-129, 2012.
- 國井美羽, 大森孝一: 〈特集 耳鼻咽喉科疾患の病態と診断・治療(Ⅱ)〉扁桃周囲炎. *医学と薬学*, **67**(4): 531-535, 2012.
- 横山秀二, 佐藤 聡, 小野美穂, 鈴木茂憲, 大森孝一: 若年者の摂食嚥下障害に対し嚥下造影を用いた食事指導が有用であった2例. *嚥下医学*, **1**(1): 218-219, 2012.
- 佐藤 聡, 横山秀二, 小野美穂, 鈴木茂憲, 大森孝一: 縦隔病変による食道期嚥下障害の2症例. *嚥下医学*, **1**(1): 219, 2012.
- 西條 聡, 松塚 崇, 國井美羽, 鈴木政博, 野本幸男, 横山秀二, 大森孝一: 当科における上咽頭癌治療の成績. *福島県医学雑誌*, **62**(2): 60, 2012.
- 多田靖宏, 西條 聡, 谷亜希子, 鈴木輝久, 大森孝一: 当科における音声障害診療の研修プログラム. *音声言語医学*, **53**(1): 47-48, 2012.



菅野和広, 多田靖宏, 鈴木輝久, 荒川愛子, 小針香菜, 今泉光雅, 谷重希子, 大森孝一: 機能性失声症患者に対する訓練の工夫. 音声言語医学, **53**(1): 79, 2012.

前川圭子, 中川美穂, 雲井一夫, 岩城 忍, 田邊牧人, 大森孝一: 声帯萎縮・声帯溝症に対する音声治療. 音声言語医学, **53**(1): 87-88, 2012.

---

◆ 学会等の発表 ◆

1) 著 書

大森孝一: 言語障害. 「今日の治療指針 2012 年版」[デスク判]. 山口 徹, 他総編集, 医学書院, 東京, 1277-1278, 2012.

大森孝一: 言語障害. 「今日の治療指針 2012 年版」[ポケット判]. 山口 徹, 他総編集, 医学書院, 東京, 1:1277-1278, 2012.

大森孝一: 石川和夫, 大森孝一, 他編訳: Laryngoscope 日本語版. 東京, Wiley-BlackWell, 2012, 9(1), April.

大森孝一: 石川和夫, 大森孝一, 他編訳: Laryngoscope 日本語版. 東京, Wiley-BlackWell, 2012, 9(2), August.

大森孝一: 石川和夫, 大森孝一, 他編訳: Laryngoscope 日本語版. 東京, Wiley-BlackWell, 2012, 9(3), December.

2) 学会等の発表

Nakamura, T.: In situ Tissue Engineering. Annual Meeting of The Korean Bronchoesophagological Society (2012.5.12 Seoul(Korea))招待講演

中村達雄: 人工神経管(PGA-tube)による末梢神経再生と in situ Tissue Engineering(生体内再生). 第 32 回日本臨床麻酔学会(2012.11.1. 福島)招待講演

茂野啓示: 咬合治療の実際. Kim 講演会(2012.9.2. 東京)

Shigeno, K., Shionoya, Y., Nakada, A., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Hashimoto, Y., Inada, Y., Nakamura, T.: REGENERATION OF CANINE INFERIOR ALVEOLAR NERVE BY POLYGLYCOLIC ACID-COLLAGEN TUBE. 39th Annual ESAO Congress(2012.9.26-29. Rostock(Germany))

Kaneko, M., Wakatsuki, M., Shigeno, K., Nakada, A., Nakamura, T.: THE EXPERIMENT OF THE BONE REGENERATION IN THE CANINE FRONTAL SINUS. 39th Annual ESAO Congress(2012.9.26-29. Rostock(Germany))

Wakatsuki, M., Kaneko, M., Sasauchi, K., Nakada, A., Shigeno, K., Nakamura, T.: PROMOTION OF BONE REPAIRING BY USE OF NOVEL COLLAGEN SCAFFOLDS IN RABBIT SKULL DEFECT MODEL. 39th Annual ESAO Congress(2012.9.26-29. Rostock(Germany))

中田 顕: 弱変性 collagen fiber scaffold の有用性について. 日本再生医療学会(2012.6.12-14. 横浜)

大野 覚, 平野 滋, 水田匡信, 金丸眞一, 梶谷一郎, 伊藤壽一: 声帯創部における末梢血中の間葉系幹細胞の働き. 第 24 回日本喉頭科学会総会・学術講演会(2012.3.8-9. 金沢)

Ohno, S., Hirano, S., Kanemaru, S., Mizuta, M., Ishikawa, S., Tateya, I., Nakamura, T., Ito, J.: Role of Circulating Mesenchymal Stem Cells in Vocal Fold Wound Healing. The 92nd Annual Meeting of The American Bronchoesophagological Association.(2012.4.19. San Diego(USA))

宇治正人: プレオマイシン肺障害ラットモデルに対する脂肪幹細胞静脈投与による治療効果の検討. 第 11 回日

本再生医療学会総会(2012.6.12-14. 横浜)

Mizuta M., Hirano S., Ohno S, Tateya I., Kanemaru S., Ito J.: Investigation of the localization of reactive oxygen species during wound healing of vocal folds in a rat model. The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association.(2012.4.18-19. San Diego(USA))

水田匡信, 平野 滋, 大野 覚, 楯谷一郎, 金丸眞一, 伊藤壽一. 声帯創傷治癒過程における活性酸素の局在についての検討. 第113回日本耳鼻咽喉科学会.(2012.5.10-12. 新潟)

水田匡信, 平野 滋, 大野恒久, 伊藤壽一. 加齢ラット声帯に対する肝細胞増殖因子の再生効果. 第12回日本抗加齢医学会(2012.6.22-24. 横浜)

稲田有史: 献血後神経損傷と献血後総和神経障害, その違いと対策. 平成23年度中部地域血液センター採血課(係)長会議(2012.2.2. 瀬戸)招待講演

稲田有史: 運動器の痛みの治療. 奈良医大整形外科・臨床研修医合宿研修(2012.5.27. 奈良)招待講演

稲田有史: 機能再建のマイスターは何を見ているのか?. 札幌徳洲会病院こけら落とし講演(2012.7.13. 北海道)招待講演

稲田有史: 四肢神経障害性疼痛に対する外科的治療の実際. 第29回立山セミナープログラム(2012.7.28. 富山市)招待講演

Omori K, Imaizumi M, Nomoto Y, Otsuki K, Nakamura T: Potential of induced pluripotent stem cells for regeneration of the tracheal wall. COLLEGIUM Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum, 2012. 8. 26-29, Roma, Italy.

# 幹細胞研究部門

## 発生分化研究分野

Department of Development and Differentiation

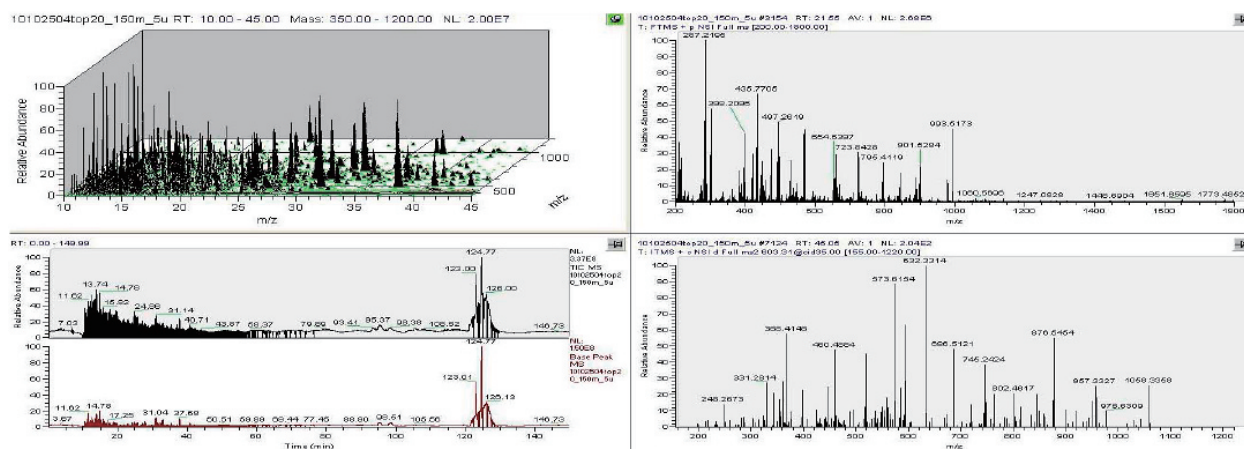
分野主任 教授 中辻 憲夫

Prof. Norio Nakatsuji

### 【研究概要】

個体を構成する細胞系譜は全て一つの受精卵から多能性幹細胞、組織幹細胞等を経て成熟分化を行う。各種の体細胞はそれぞれ特異的な機能発現を行い生体の恒常性を維持する一方、生殖細胞は発生初期に多能性幹細胞から体細胞とは系譜が分かれ、配偶子形成プロセスを通じてゲノム情報の維持と再編、エピゲノム修飾の再構成等を行い、次の個体発生の為の遺伝プログラムを継承する。これら幹細胞－生殖細胞サイクルにおけるゲノム、エピゲノムプログラムは個体及び種が成立する根幹として厳密に制御される一方、その破綻は広範な疾患、例えば発生異常、遺伝病、癌、不妊等の病態の起因となる。当研究グループは幹細胞－生殖細胞の発生分化とゲノム－エピゲノム制御機構の特性解明、またその理解に基づく細胞－ゲノムの人為操作の技術基盤の創出を目指し、分子生物学、生化学、遺伝学、オミクス解析、また新たな実験系の開発を併せて研究を進めている。

(1)生殖顆粒構成分子によるレトロトランスポゾン抑制とゲノム保護：生殖細胞に顕著に観察される構造的特徴に生殖顆粒 RNP 構造が挙げられる。我々はマウス生殖顆粒の特異的な構成分子をコードする tudor 関連 Tdrd 遺伝子群の機能解析を進めている。Tdrd 遺伝子群のノックアウトマウスを作製した所、これら遺伝子のホモ欠損個体はいずれも雄生殖細胞の分化に異常を示す事が明らかとなった。このうち TDRD1, 9 はマウス piwi ファミリー MILI, MIWI2 と相互作用し、雄生殖幹細胞において piRNA 経路を介してレトロトランスポゾン LINE-1 の RNA、エピゲノムレベルでの抑制に機能する。一方、TDRD6, 7 は精子細胞の半数体成熟に働く。生殖顆粒は体細胞の processing body, stress granule 等と分子構成が類似しており、現在生殖細胞の RNA 制御、ストレス反応等について解析を進めている。(2)減数分裂を制御する開始シグナルとクロマチン動態：幹細胞－生殖細胞サイクルにお



マウス胚性幹(ES)細胞のプロテオーム解析。核動態に注目して MudPIT 法及び SILAC 法を用いた LC-MS/MS 解析により数千蛋白質の一斉同定と相対定量解析を進めている。

Proteomic analysis of mouse embryonic stem (ES) cells by MudPIT, SILAC and LC-MS/MS.

いてゲノム情報の安定な継承は個体、種の成立に重要である一方、配偶子形成過程では減数分裂による1倍体化と相同遺伝子組換えによって遺伝情報の多様性が生まれる。減数分裂の制御機構の研究は主に酵母等の単細胞生物を用いて行われており、多細胞生物において詳細な分子基盤の解明は進んでいない。我々は精原幹細胞の樹立細胞株(GS細胞)を用いて体細胞型増殖から第1減数分裂前期を誘導する培養実験条件を作出した。この培養系を用いて減数分裂を促進および抑制するシグナル経路を同定し、分子から個体レベルでの詳細な研究を進めている。一方、減数分裂期のクロマチン制御やシグナル伝達の関与が推測される遺伝子群を蛋白質ドメイン構造、発現パターン、進化的保存等によりデータベースからスクリーニングしノックアウトマウス作成等による遺伝学的、生化学的解析を進めている。(3)幹細胞-生殖細胞の発生サイクルにおけるゲノム恒常性維持の分子ネットワーク：ES細胞は明確な分裂寿命が認められずゲノム損傷によるG1チェックポイントが観察されない。またES細胞のDNA変異率は他の体細胞と比べて低くDSB修復はHR経路がNHEJ経路よりも優位に利用され染色体不安定性のスペクトルはES細胞と分化体細胞とで異なる。これらES細胞と分化体細胞の相違はゲノム損傷応答の制御の違いによるものと考えられるがその分子機序は殆ど明らかになっていない。我々はES細胞やGS細胞のプロテオーム解析を中心としたマルチオミクス解析を行う事で幹細胞-生殖細胞サイクルのゲノム維持機構、特にDNA損傷に対する修復ダイナミクスとクロマチン動態の分子ネットワーク解明を目指して研究を進めている。

The germline is the cell lineage that gives rise to full ontogenesis of individuals and transmits genetic information to next generations. During the differentiation of germ cells, important biological processes take place, such as epigenetic reprogramming, establishment of pluripotency and genetic DNA recombination. Our current research focuses on the molecular characterization of germinal granules/nuage, germline-specific ribonucleoprotein (RNP) assemblies in the cytoplasm, and the regulation of meiotic entry and chromatin dynamics.

One structural characteristic observed in the germline is a cytoplasmic RNP domain called germinal granules or nuage. The germinal granule/nuage is evolutionarily conserved in divergent animals, suggesting its essential and common role in the germline, but the precise molecular and physiological function(s) remains unclear. We are working on tudor-domain containing (Tdrd) genes, mainly Tdrd1, 6, 7 and 9, which encode for specific components of mammalian germinal granules/nuage. Gene-targeted disruption of Tdrd1, 6, 7 and 9 all led to male-specific sterility due to postnatal defects in spermatogenesis. Among these, TDRD1 and TDRD9 cooperate with piwi proteins, MILI and MIWI2, respectively, and function non-redundantly in retrotransposon silencing at RNA and epigenetic levels in spermatogonial stem cells and subsequent spermatogenesis. In contrast, Tdrd6 and 7 function in haploid spermiogenesis. Tdrd6 and 7 mutants show abnormal spermatid differentiation with aberrant chromatoid body architectures. Chromatoid bodies, a specialized form of germinal granules/nuage in spermatids, share some of their components with somatic processing bodies (p bodies), a form of RNP implicated in degradation or translational control of mRNA. We are addressing the possible function of TDRD6 and 7 in the regulation/metabolism of RNA.

Molecular mechanisms controlling meiotic entry and chromatin dynamics are important research subjects in cell and developmental biology. We previously showed that primordial germ cells autonomously enter into meiosis when cultured in vitro and identified a factor that suppresses this meiotic transition from mitosis. Recently, we established another in vitro culture system that induces meiosis initiation of an established germline stem cell line derived from spermatogonia. By using this culture system, we identified signaling molecules that promote or inhibit meiosis from mitotic spermatogonial stem cells. We are undertaking biochemical and genetic characterization of

these signaling pathways in vitro and in vivo.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

- Wada, T., Goparaju, S. K., Tooi, N., Inoue, H., Takahashi, R., Nakatsuji, N. and Aiba, K. Amyotrophic lateral sclerosis model derived from human embryonic stem cells overexpressing mutant superoxide dismutase 1. *Stem Cells Translational Medicine* 1 : 396-402(2012)
- Hasegawa, K., Yasuda, S., Teo, J.-L., Nguyen, C., McMillan, M., Hsieh, C.-L., Suemori, H., Nakatsuji, N., Yamamoto, M., Miyabayashi, T., Lutzko, C., Pera, M. F. and Kahn, M. Wnt signaling orchestration with a small molecule DYRK inhibitor provides long-term xeno-free human pluripotent cell expansion. *Stem Cells Translational Medicine* 1 : 18-28(2012)
- Otsuji, T. G., Kurose, Y., Suemori, H., Tada, M. and Nakatsuji, N. Dynamic Link between histone H3 acetylation and an increase in the functional characteristics of human ESC/iPSC-derived cardiomyocytes. *PLoS One* 7(9): e45010(2012)
- Minami, I., Yamada, K., Otsuji, T. G., Yamamoto, T., Shen, Y., Otsuka, S., Kadota, S., Morone, N., Barve, M., Asai, Y., Tenkova-Heuser, T., Heuser, J. E., Uesugi, M., Aiba, K. and Nakatsuji, N. A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. *Cell Reports* 2(5): 1448-1460(2012)
- Tsuneyoshi, N., Kim Tan, E. K., Sadasivam, A., Poobalan, Y., Sumi, T., Nakatsuji, N., Suemori, H., and Dunn, N. R. The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells. *Genes Dev.* 26 : 2471-2476(2012)
- Kadota, S., Minami, I., Morone, N., Heuser, J. E., Agladze, K. and Nakatsuji, N. Development of a reentrant arrhythmia model in human pluripotent stem cell-derived cardiac cell sheets. *European Heart Journal* | Published online 30 November 2012 | DOI : 10.1093/eurheartj/ehs418
- Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K. and Kawase, E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nature Communications* 3 : 1236(2012)
- Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013 Jan 5; 368(1609): 20110338.
- Xiol J, Cora E, Kogelgruber R, Chuma S, Subramanian S, Hosokawa M, Reuter M, Yang Z, Berninger P, Palencia A, Benes V, Penninger J, Sachidanandam R, Pillai RS. A role for Fkbp6 and the chaperone machinery in piRNA amplification and transposon silencing. *Mol Cell.* 2012 Sep 28; 47(6): 970-9.
- Pillai RS, Chuma S. piRNAs and their involvement in male germline development in mice. *Dev Growth Differ.* 2012 Jan 6.
- Morozumi Y, Ino R, Takaku M, Hosokawa M, Chuma S, Kurumizaka H. Human PSF concentrates DNA and stimulates duplex capture in DMCI-mediated homologous pairing. *Nucleic Acids Res.* 2012 Apr; 40(7): 3031-41.



## 2) 著 書

Tahimic, C. G. T., Sakurai, K., Aiba, K. and Nakatsuji, N. Cre/loxP, Flp/FRT Systems and Pluripotent Stem Cell Lines. In: S. Renault and P. Duchateau (eds.), Site-directed Insertion of Transgenes. Topics in Current Genetics vol. 23 chapter 7 (Springer), 189-209 (2012)

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

中辻憲夫 ランチョンセミナー「ヒト ES/iPS 細胞研究の現状と医学創薬応用への展望」第 53 回日本哺乳動物卵子学会 2012 年 4 月 1 日 大阪千里

Norio Nakatsuji “Chemical control of human pluripotent stem cell differentiation and creation of neurodegenerative disease model cells” British Society for Developmental Biology, British Society for Cell Biology and Japanese Society of Developmental Biologists Joint Spring Meeting 2012 年 4 月 17 日 Warwick (UK)

中辻憲夫「ヒト ES/iPS 細胞の細胞治療と創薬応用に向けた研究開発：化合物による幹細胞制御と大量培養システムの技術開発」第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 13 日 横浜

中辻憲夫 ランチョンセミナー「ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) の再生医療・創薬応用－世界の現状と展望」日本薬物動態学会第 27 回年会 2012 年 11 月 20 日 東京

中辻憲夫 特別講演「ヒト ES/iPS 細胞研究の現状と医学創薬応用への展望」第 62 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2012 年 12 月 1 日 大阪

Norio Nakatsuji Plenary Discussion “Leading Institutions and their strategies for advancing regenerative medicine” World Stem Cell Summit 2012 2012 年 12 月 5 日 West Palm Beach (Florida)

中馬新一郎. 生殖系列サイクルにおけるゲノム情報の継承と再編. 山口大学獣医学科特別セミナー (2012.2.16, 山口)

中馬新一郎. 哺乳類生殖幹細胞株の減数分裂誘導とクロマチン動態の制御. 新学術領域遺伝情報場第 5 回班会議 (2012.6.24, 北海道)

中馬新一郎. 生殖幹細胞の増殖分化転換とゲノム－エピゲノム制御. 特定領域研究細胞増殖制御終了シンポジウム (2012.8.30, 東京)

Shinichiro Chuma. Germline piwi pathway genes and genome protection in spermatogenesis. Kyoto university GCOE retreat 2012 (2012.10.5, Awaji)

中馬新一郎. Transcriptional and epigenetic profiling of germline stem cells and meiotic transition. 特定領域研究生殖系列サイクル第 5 回班会議 (2012.11.22, 京都)

細川美穂子, 刀谷在美, 林 瑛理, 望月綾子, 末盛博文, 沼田興治, 阿部訓也, 田中 敬, 篠原美都, 篠原隆司, 中辻憲夫, 中馬新一郎. マウス生殖幹細胞のゲノム－エピゲノム解析. 日本遺伝学会第 84 回大会 (2012.9.26, 福岡)

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Koji Numata, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Takashi Tanaka, Hirofumi Suemori, Kuniya Abe, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma. Transcriptional and epigenetic landscape of mouse germline stem cells. CSHL Meeting Germ Cells (2012.10.3, USA)

Ayako L. Mochizuki, Eri Hayashi, Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Gen Kondoh, Norio Nakatsuji, Shinichiro

Chuma. The role of N16 in maintenance of DNA stability in mouse embryonic stem cells. 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会(2012.5.13, 神戸)

Ayako L. Mochizuki, Eri Hayashi, Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Gen Kondoh, Kento Minamino, Kayo Inaba, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma. The role of N16 in maintenance of DNA stability and recombination in mice. Kyoto university GCOE retreat 2012(2012.10.5, Awaji)

刀谷在美. 多能性幹細胞及び生殖細胞のプロテオミクス解析. 特定領域生殖サイクル若手勉強会 2012(2012.7.26 仙台)

## 2) 講演・シンポジウム

中辻憲夫「多能性幹細胞(ES/iPS細胞など)研究の現状と医学創薬への応用」岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 特別講演会：先端医学研究のトレンド 2012 年 2 月 21 日 岡山

Norio Nakatsuji “Introduction and cell-Material Integration Research at iCeMS” The 2nd German-Japanese University Presidents’ Conference 2012 年 3 月 30 日 京都

中辻憲夫「社会的課題に応える科学技術研究戦略－真にグローバルな視点に立ち、基礎研究と応用イノベーションの統合を目指せ」研究・技術計画学会第27回シンポジウム 2012 年 7 月 6 日 東京

中辻憲夫「物質－細胞融合研究拠点 iCeMS におけるヒト ES/iPS 細胞研究と医学創薬応用への展望」第33回 R&D エグゼクティブ交流会 2012 年 8 月 30 日 京都

Norio Nakatsuji “Cell-material integration for stem cell research at iCeMS, and how I began to enjoy multidisciplinary research in 1980s” HeKKSaGOn Summer School 2012 in Heidelberg 2012 年 9 月 18 日 Heidelberg

## 胚性幹細胞研究分野 Department of Embryonic Stem Cell Research

分野主任 准教授 末盛 博文

Assoc. Prof. Hirofumi Suemori

### 【研究概要】

#### ヒト ES 細胞株の樹立と臨床応用を目指した基盤研究

ヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに 5 株のヒト ES 細胞株を樹立しうち 3 株は 2004 年 3 月から、2 株は 2009 年 4 月から分配を行っている。これまでに 50 件以上の研究計画に対して細胞株を分配し多くの研究成果が上げられている。

#### 細胞プロセッシング室による臨床用ヒト ES 細胞バンクの構築

これらの十分な利用実績のあるヒト ES 細胞株を医薬品 GMP レベルでできるように動物由来成分を除去する「クリーンアップ」の条件検討を行うとともに、新たに医薬品 GMP レベルでのヒト ES 細胞株の樹立の準備に着手している。臨床レベルで使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格を構築に関する協議を関係各局と行いつつ、将来の臨床用ヒト ES 細胞バンクの準備をすすめてきた。これと並行して、臨床応用に必要な動物由来成分を用いない完全合成培地、合成基質によるヒト ES 細胞の培養技術開発を行った。臨床用 ES 細胞バンクの品質管理を国際的な水準で実施するため、ISCBI(International Stem Cell Banking Initiative)による、基礎研究用 ES 細胞バンクに品質基準の策定に続き、臨床レベルでのバンキング品質基準の策定に参画している。

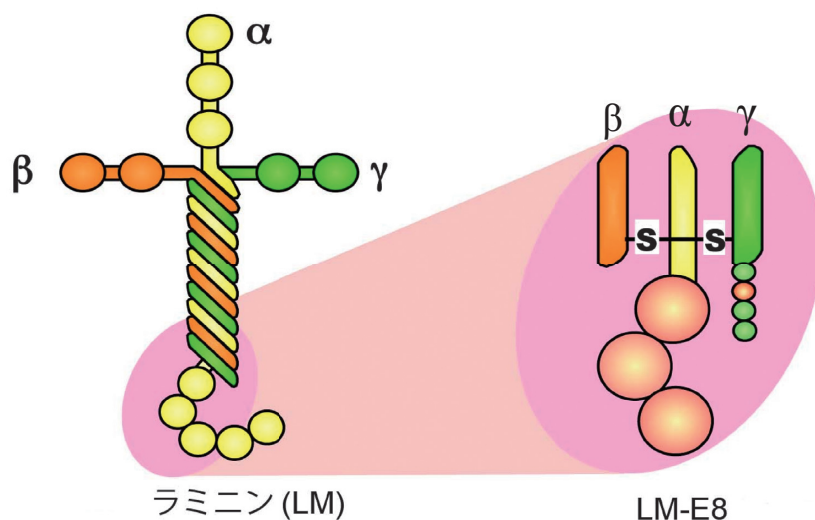


図 1 ヒト ES/iPS 細胞の大量培養に適したラミニン断片の構造  
native なラミニンは巨大なタンパク質で生産が困難であるが、今回用いたラミニン断片は効率良く製造することが可能である。

### 臨床利用に適したヒト多能性幹細胞の培養基質の開発

ヒト ES 細胞株，ヒト iPS 細胞株などのヒト多能性幹細胞株は，創薬や細胞治療に有用な細胞リソースとして期待されている．そして，そのような利用には多能性幹細胞の効率的な拡大培養法の確立が不可欠である．

我々はこれまでに組換えラミニンがヒト多能性幹細胞の培養に有効であることを示していたが，今回はさらに，ヒトのラミニンタンパク質のフラグメント (LM-E8, 図 1) がヒト多能性幹細胞に対して既存のものより細胞外基質として優れていることを見出した．通常ヒト多能性幹細胞は単一に解離すると死滅するところが，この LM-E8 を用いることで安定的な継代維持が可能であり，一ヶ月間で従来法よりも数百倍から数千倍，効率よく細胞を拡大させることが可能であることを示した．この培養法により臨床利用などにも適したヒト ES/iPS 細胞の大量培養が可能となった．

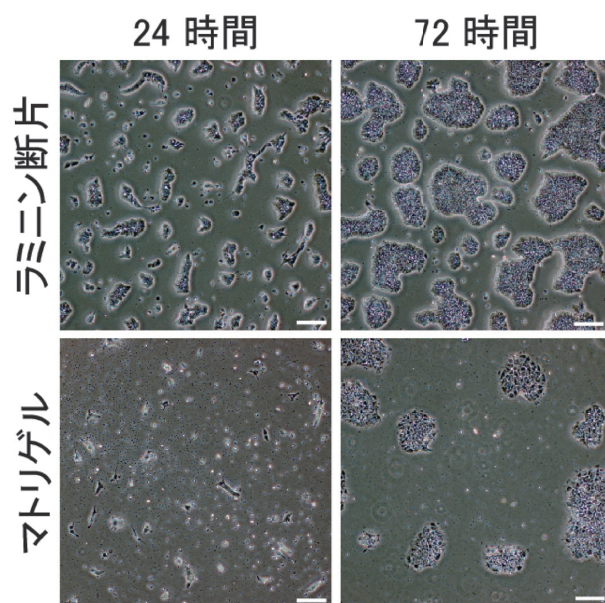


図 2 これまでよく用いられてきたマトリゲルに比べて LM-E8 では細胞が効率良く接着し，より生存増殖していく．

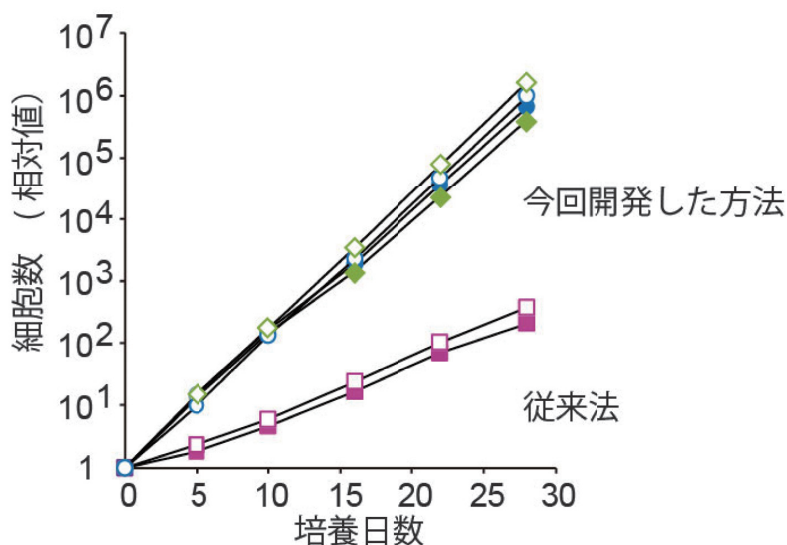


図 3 従来法に比べて，一月間に 200 倍以上の効率良く細胞を拡大することができるようになった．

### **Establishment and analysis of human ES cell lines aiming clinical application**

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture retaining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established 5 human ES cell lines. We have distributed these cell lines to over 50 researches.

### **Cell processing facility for banking of clinical grade human ES cell lines.**

For clinical application of hES cells, several issues remain to be solved such as development of complete-defined culture medium and feeder-cell free substrates. To verify these factors we should establish a standard that reaches international levels. To achieve that purpose we have been working as a member of working groups of the International Stem Cell Forum (ISCF) and banking group of ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative). Recently the ISCBI established “Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes” as a first fruit, and we are working to establish guidelines for clinical use of human ES cells.

### **Improved survival and proliferation of human pluripotent stem cells by using recombinant laminin functional fragments.**

Human ES/iPS cells have the potential to provide infinite sources of tissues for regenerative medicine. However, lack of reliable methods for large-scale expansion of stem cells with defined and/or xeno-free media hinder the realization of such potential. We showed that recombinant E8 fragments of laminin isoforms (LM-E8s) can sustain undifferentiated proliferation of singly dissociated hES/iPS cells in various defined, xeno-free media. LM-E8s enable higher adhesion of hES/iPS cells than intact laminin isoforms. We could maintain several hES/iPS cell lines after complete dissociation on LM-E8s, while sustaining a high level of expression of pluripotency markers and a normal karyotype for more than 30 passages. This culture system allows bulk proliferation of hES/iPS cells under defined, xeno-free conditions, and will be valuable for therapeutic application of hES/iPS cells.

## **【業績目録】**

### **◆ 誌上発表 ◆**

#### **1) 原著論文**

Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells.

Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K, Kawase E. Nat Commun. 2012 Dec 4 ; 3 : 1236.

Wnt signaling orchestration with a small molecule DYRK inhibitor provides long-term xeno-free human pluripotent cell expansion.

Hasegawa K, Yasuda SY, Teo JL, Nguyen C, McMillan M, Hsieh CL, Suemori H, Nakatsuji N, Yamamoto M, Miyabayashi T, Lutzko C, Pera MF, Kahn M. Stem Cells Transl Med. 2012 Jan ; 1 (1): 18-28.



The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells.

Tsuneyoshi N, Tan EK, Sadasivam A, Poobalan Y, Sumi T, Nakatsuji N, Suemori H, Dunn NR. Genes Dev. 2012 Nov 15; 26(22): 2471-6.

Dynamic link between histone H3 acetylation and an increase in the functional characteristics of human ESC/iPSC-derived cardiomyocytes.

Otsuji TG, Kurose Y, Suemori H, Tada M, Nakatsuji N. PLoS One. 2012;7(9):e45010. doi: 10.1371/journal.pone.0045010. Epub 2012 Sep 12.

Comparative study of transplantation of hepatocytes at various differentiation stages into mice with lethal liver damage.

Kamimura R, Ishii T, Sasaki N, Kajiwarra M, Machimoto T, Saito M, Kohno K, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Yasuchika K, Uemoto S. Cell Transplant. 2012 Apr 2. [Epub ahead of print]

Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease.

Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, Motono M, Sasai Y, Saiki H, Gomi M, Yoshikawa T, Hayashi H, Shinoyama M, Refaat MM, Suemori H, Miyamoto S, Takahashi J. Stem Cells. 2012 May; 30(5): 935-45.

Efficient and accurate homologous recombination in hESCs and hiPSCs using helper-dependent adenoviral vectors. Aizawa E, Hirabayashi Y, Iwanaga Y, Suzuki K, Sakurai K, Shimoji M, Aiba K, Wada T, Tooi N, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Mol Ther. 2012 Feb; 20(2): 424-31.

## 2) 総 説

菅 三佳, 高田 圭, 小原有弘, 末盛博文, 青井貴之, 中村幸夫, 古江-楠田美保 ヒト多能性幹細胞の命名法の国際統一規格案について 再生医療 11: 72-77 2012

## ◆ 学会等の講演 ◆

### 1) 学会・研究会発表

蛍光プローブ(KP-1)のES/iPS細胞特異的蓄積におけるABCタンパク質の関与 富岡麻衣子, 藤林悠人, 平田直, 山内香織, 南 一成, 永田 紅, 山中伸弥, 中辻憲夫, 末盛博文, 上杉志成, 植田和光 第85回日本生化学会年会 2012年12月14-16日(福岡)

Recombinant E8 fragments of human laminin isoforms support the efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells under defined and xeno-free condition.

Takamichi Miyazaki, Sugiko Futaki, Hirofumi Suemori, Yukimasa, Taniguchi, Masashi Yamada, Miwa Kawasaki, Maria Hayashi, Hideaki Kumagai, Norio Nakatsuji, Kiyotoshi Sekiguchi, Eihachiro Kawase

ISSCR2012(国際幹細胞学会 第10回年次大会), 2012年6月13日~16日 パシフィコ横浜

MANUFACTURING AND BANKING OF CLINICAL-GRADE HUMAN EMBRYONIC STEM CELL LINES IN A GMP FACILITY

Takada Kei, Hirai Masako, Kawase Eihachiro, Hamao Mari, Kashigi Fumi, Suemori Hirofumi, Nakatsuji Norio, Takahashi Tsuneo A.

ISSCR2012(国際幹細胞学会 第10回年次大会), 2012年6月13日～16日 パシフィコ横浜

RECOMBINANT HUMAN LAMININ E8 FRAGMENTS(LM-E8s)SUPPORT THE EFFICIENT ADHESION AND EXPANSION OF DISSOCIATED HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS UNDER DEFINED AND XENO-FREE CONDITION.

Miyazaki, Takamichi, Futaki, Sugiko, Suemori, Hirofumi, Taniguchi, Yukimasa, Yamada, Masashi, Kawasaki, Miwa, Hayashi, Maria, Kumagai, Hideaki, Nakatsuji, Norio, Sekiguchi, Kiyotoshi, Kawase, Eihachiro

World Stem Cell Summit 2012, 2012年12月3日～5日, Florida, USA

## 幹細胞分化制御研究分野 Department of Stem Cell Differentiation

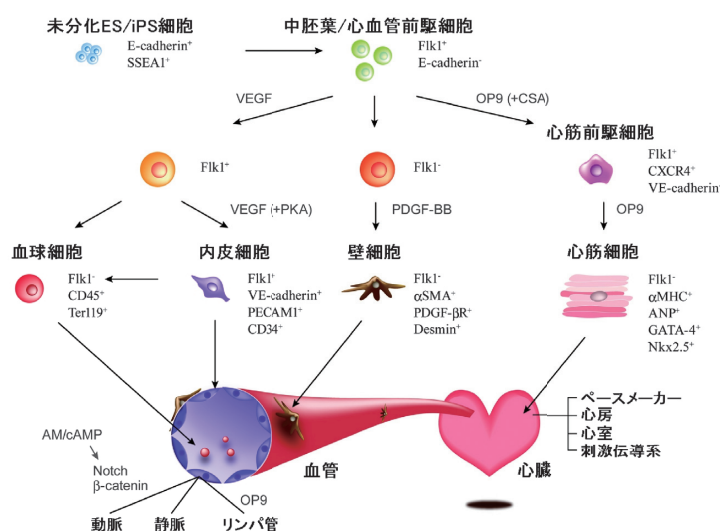
分野主任 教授 山下 潤

Prof. Jun K. Yamashita

### 【研究概要】

幹細胞分化制御研究分野では、ES 細胞(胚性幹細胞: embryonic stem cells)及び iPS 細胞(人工多能性幹細胞: induced pluripotent stem cells)を用いて、心血管系の細胞分化・再生に関する研究を行っている。

ES 細胞は、全ての種類の細胞に分化することができるいわゆる「万能」幹細胞と考えられている。この全能性(pluripotency)を in vitro において引き出し、分化誘導した細胞を再生治療に用いようとする試みが様々な臓器、細胞をターゲットに行われている。我々は、ES 細胞を用いて中胚葉由来組織である血管および心臓の分化研究を行ってきた。



血管は、内腔を一層におおう内皮細胞とそれを外から取りまく壁細胞の2種類の細胞からなっている。その中を流れる血球細胞を含めてこれら血管構成細胞は互いに密接に関連しあい血管を形作る。VEGFの受容体の一つであるFlk1は血球・血管系細胞の最も早期の分化マーカーおよび中胚葉のマーカーと考えられている。我々は、ES細胞を用いてin vitroにおいて中胚葉、さらには血管の構成細胞である血管内皮細胞と壁細胞(血管平滑筋細胞およびペリサイト)を選択的に分化誘導し、最終的に血管としての高次構造をin

vitro および in vivo において構築すること、いわば血管の発生過程を再現することに成功した(Yamashita, *Nature*, 2000.)。この in vitro 分化系では、Flk1 陽性細胞を共通の前駆細胞として、内皮細胞、壁細胞、血球細胞が分化し、さらにそれらの細胞が血管としての高次構造を形成する。また、中胚葉由来の細胞の一つである心筋細胞も同様に Flk1 陽性細胞から分化誘導することと共に新しい心筋前駆細胞の同定に成功している(Yamashita, *FASEB J*, 2005)。動静脈リンパ管内皮細胞分化や心筋ペースメーカー細胞などさらに多様な心血管細胞の分化誘導を行っている(Yamashita, *Trends Cardiovasc Med*, 2007; Yanagi, *Stem Cells*, 2007 他)(図)。最近我々は、免疫抑制剤のサイクロスポリン A が Flk1 陽性中胚葉細胞に特異的に作用し、心筋前駆細胞及び心筋細胞の分化を促進する、という全く新しい作用を見出した(Yan, *Biochem Biophys Res Commun*, 2009)。本研究をもとに心筋細胞の効率的分化を誘導する低分子化合物の探索を行っている。これら技術と細胞シート作製技術(東京女子医科大学)を組み合わせ、心筋梗塞重急性期における心臓細胞シート移植の効果と作用機構を明らかにした(Masumoto, *Stem Cells*, 2012)。また、血管内皮細胞分化を培養下において構成的に再現することにより、cAMP シグナルの意義を次々に明らかにした。すなわち、Protein kinase A が血管前駆細胞の VEGF への感受性を変化させて内皮細胞分化を促進していること

(Yamamizu, **Blood**, 2009), 同作用が CREB による転写因子 Etv2 発現誘導によること (Yamamizu, **Stem Cells**, 2012), 痛覚に関与するオピオイドが cAMP シグナルを抑制することにより内皮分化・血管形成に抑制的に作用していること (Yamamizu, **Blood**, 2011 表紙), 及び Notch と  $\beta$ -catenin が直接相互作用することにより動脈内皮への運命決定を行っていることを新たに示した (Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010). また PKA シグナルの幹細胞分化早期における意義を検討し, PKA がヒストン H3 メチル化酵素 G9a の発現を増加させることにより, Oct4 など未分化遺伝子への負のヒストン修飾(リジン 9 ジメチル化)を促進し, 細胞分化を早めることを示し, シグナルとエピゲノム制御の新しい連関とそれによる分化タイミングの制御機構を明らかにした (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012).

さらに, 最近本研究所山中伸弥教授によって樹立された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて同様の実験システムを構築し, 新たな心血管再生研究を開始している. ES 細胞研究において蓄積したノウハウを用いていち早くマウス iPS 細胞を用いた心血管系細胞の分化誘導に成功した (Narazaki, **Circulation**, 2008). またサイクロスポリン A の作用を応用し, ヒト iPS 細胞からの機能心筋細胞を誘導することにも成功した (Fujiwara, **PLoS One**, 2011). さらに高効率な新しいヒト iPS 細胞の心筋分化法と誘導心筋細胞の純化法の開発にも成功した (Uosaki, **PLoS One**, 2011).

このように我々の ES 細胞を用いた in vitro 分化系は, 種々の循環器系の細胞群を系統的に分化誘導することができ, 心血管の発生分化過程を培養下に恣意的に操作しながらしかも経時的に観察できる. 従って, この分化系を用いることにより心臓血管の発生分化のメカニズムを細胞レベル, 分子レベルで検討し, ノックアウトマウスの形質解析に依存していた分化の分子機構の解析を in vitro で行うという新しいアプローチが可能になったと考えられた. またこれらの知見を様々な形で再生医療を中心とした応用研究に展開することができる.

現在, この ES 細胞 in vitro 分化系を用いて, 以下のようなプロジェクトを遂行している.

## 1. ES 細胞/iPS 細胞 in vitro 分化系を用いた心血管細胞分化多様化の分子機構の解析

### 1) DNA チップを用いた網羅的心血管分化関連遺伝子の同定

1) 動静脈・リンパ管内皮特異的分化誘導と内皮細胞多様化機構の解析 (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007; Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010)

2) cAMP 及び PKA による血管内皮細胞の分化能調節機構 (Yamamizu, **Blood**, 2009; Yamamizu, **Stem Cells**, 2012)

3) 血管内皮分化/血管形成及び腫瘍形成におけるオピオイドの意義 (Yamamizu, **Blood**, 2011 表紙) (星薬科大学との共同研究)

4) ES/iPS 細胞分化過程におけるエピジェネティクス制御機構の関与と意義 (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012) (東京大学との共同研究)

## 2. ES 細胞/iPS 細胞からの心血管細胞の分化誘導と再生治療応用

1) 2 次元培養による新しい ES 細胞からの心筋細胞分化誘導法の開発と新しい心筋前駆細胞の同定 (Yamashita, **FASEB J**, 2005).

2) 心筋細胞 in vitro 分化系を用いた心筋分化・多様化の分子機構の解析

3) ES 細胞由来心筋細胞自動能形成機構の解析 (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)

4) サイクロスポリン A を用いた新しい高効率心筋前駆細胞・心筋細胞分化誘導法 (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009; Fujiwara, **PLoS One**, 2011) (京都大学心臓血管外科・内分泌代謝内科との共同研究)

5) ヒト ES 細胞からの心血管細胞分化誘導

ヒト ES 細胞使用計画「ヒト ES 細胞を用いた心血管細胞分化機構に関する研究」(研究代表者・山下 潤, 平成 17 年 3 月 10 日 文部科学大臣承認)

ヒト ES 細胞を用いた心血管分化研究を行っている。

6) iPS 細胞を用いた心血管分化再生に関する研究

i) マウス iPS 細胞からの心血管細胞分化系 (Narazaki, **Circulation**, 2008; **Best Paper Award** in Basic Science category, *Circulation* 2008)

ii) 新しい高効率ヒト心筋分化誘導法の開発と VCAM1 を表面抗原として用いた新しい心筋細胞純化法の開発 (Uosaki, **PLoS One**, 2011)

iii) iPS 細胞由来心臓細胞シートを用いた細胞移植治療の開発 (Masumoto, **Stem Cells**, 2012) (東京女子医大・京都大学心臓血管外科との共同研究)

iv) ヒト iPS 細胞分化における心筋前駆細胞の誘導と純化

7) iPS 細胞分化システムのケミカルバイオロジー及び創薬応用 (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (早稲田大学他との共同研究)

8) 心筋細胞分化・増殖を促進する新しい化合物の探索・同定

**Main theme of our research**: Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular development and the application to cardiovascular regeneration using *in vitro* differentiation system of embryonic stem (ES) cells and induced pluripotent stem (iPS) cells.

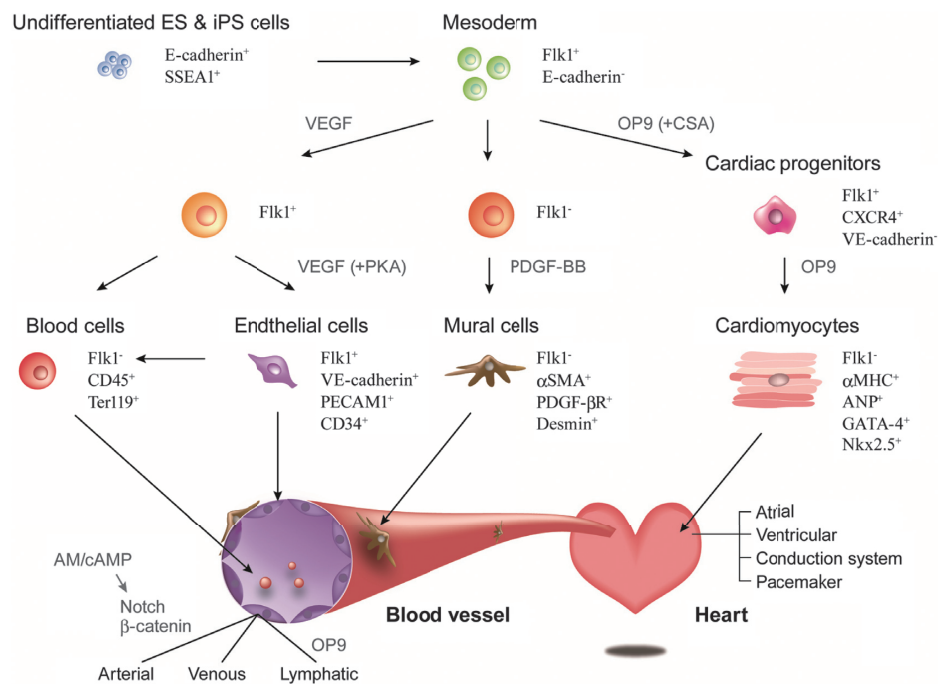
Previously, we established a novel *in vitro* vascular differentiation system of ES cells (Yamashita, **Nature**, 2000). Using ES cell-derived Flk1 (VEGF receptor-2)-positive mesodermal cells as starting material, we can induce all of the vascular cellular compartments, that is, endothelial cells, mural cells (vascular smooth muscle cells and pericytes) and blood cells. Vessel-like structures of endothelial cell tube with mural cell attachment and blood cell inside are formed from Flk1+ cell aggregates in 3-D culture. Thus, this *in vitro* system should reproduce the early process of vascular development. And we also demonstrated that the transplanted vascular cells induced by this system could contribute to developing vasculature *in vivo*. Moreover, we have succeeded in inducing cardiomyocytes from Flk1+ cells, and identifying a novel cardiac progenitor cells (Yamashita, **FASEB J**, 2005). Recently, we succeeded in inducing arterial, venous, and lymphatic endothelial cells (Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007 etc). All of cardiovascular cellular components, thus, could be induced in our *in vitro* differentiation system. (Fig. 1). Recently, we found that an immunosuppressant, cyclosporin-A, possesses a novel effect to potently induce cardiomyocytes and cardiac progenitors from Flk1+ mesoderm cells (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009). Currently, we are screening to identify small molecules which can induce efficient cardiomyocytes from pluripotent stem cells and could be effective for cardiac regeneration *in vivo*. Combining our technologies in stem cells and a cell sheet method (Tokyo Women's Medical University), we generated a cardiac cell sheet with defined cardiac cell populations (i.e. cardiomyocytes, endothelial cells, and vascular mural cells), and succeeded in showing potent restoration effect on infarcted hearts after sheet transplantation (Masumoto, **Stem Cells**, 2012). Using our constructive induction system for vascular cells, we recently demonstrated critical roles of cAMP/PKA signaling in endothelial cell differ-



entiation and diversification. That is, protein kinase A (PKA) enhances vascular progenitor potential to endothelial competent through dual upregulation of VEGF receptors, Flk1 and neuropilin1, in Flk1<sup>+</sup> cells (Yamamizu, **Blood**, 2009). This effect is mediated by CREB-induced gene expression of an Ets family transcription factor, Ets2 (Yamamizu, **Stem Cells**, 2012). A neurophysiological modifier, opioid system, is found to regulate endothelial cell differentiation and early vascular formation through inhibition of cAMP/PKA pathway (Yamamizu, **Blood**, 2011; cover image). We also demonstrated that Notch and  $\beta$ -catenin directly interact in Flk1<sup>+</sup> cells and determine arterial endothelial cell fate (Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010). We further examined new roles of PKA signaling in the earlier stage of differentiation from pluripotent stem cells, and demonstrated a novel signal-epigenome linkage that regulated timing of pluripotent stem cell differentiation. That is, activation of PKA induced rapid differentiation of germ layer cells from the pluripotent state by increasing protein expression of a histone methyltransferase, G9a, which suppressed pluripotent gene expressions through a negative histone modification, H3K9me2 (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012).

Recently, we have started new research with the use of novel adult tissue derived pluripotent stem cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, and succeeded in systematic cardiovascular cell differentiation of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008). We recently succeeded in inducing functional cardiomyocytes from human iPS cells using cyclosporin-A method (Fujiwara, **PLoS One**, 2011). We further succeeded in efficiently inducing cardiomyocytes from human iPS cells and identifying a cell surface molecule, VCAM1, for purification of cardiomyocytes (Uosaki, **PLoS One**, 2011).

In this system, we can manipulate the fate of cell differentiation, observe the behavior of differentiating cells, purify and obtain cells at various differentiation stages. This system provides us possibilities to dissect the mechanisms of cardiovascular development from new aspects, and offers novel potentials for cardiovascular regeneration.



**Fig. 1 : Cardiovascular development in ES and iPS cell *in vitro* differentiation**

## Research Projects :

### 1. Elucidation of cellular and molecular mechanisms of cardiovascular cell differentiation and specification using ES/iPS cell *in vitro* differentiation system.

- 1) Specific induction of various endothelial cells types (i.e., arterial, venous, and lymphatic) and investigation of the mechanisms for endothelial specification (Yurugi-Kobayashi, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006 ; Kono, **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2006 ; Yamashita, **Trends Cardiovasc Med**, 2007 ; Yamamizu, **J Cell Biol**, 2010).
- 2) PKA in the regulation of vascular progenitor potential (Yamamizu, **Blood**, 2009 ; Yamamizu, **Stem Cells**, 2012)
- 3) Significance of opioids in endothelium differentiation, vascular formation, and tumor growth (Yamamizu, **Blood**, 2011 ; cover image) (collaboration with Hoshi University)
- 4) Significance of epigenome regulation in pluripotent stem cell differentiation processes, mainly with global analyses of epigenetics in ES/iPS cell differentiation (Yamamizu, **Cell Stem Cell**, 2012) (Collaboration with University of Tokyo)

### 2. Cardiovascular cell induction from ES/iPS cells and application to regeneration

- 1) Establishment of a novel cardiomyocyte induction system in 2-dimensional culture (Yamashita, **FASEB J**, 2005).
- 2) Dissection of cellular and molecular mechanisms of cardiomyocyte differentiation
- 3) Ion channels to reconstitute automaticity of ES cell-derived cardiomyocytes (Yanagi, **Stem Cells**, 2007)
- 4) Specific and efficient expansion of cardiac progenitor cells and cardiomyocytes by cyclosporin-A (Yan, **Biochem Biophys Res Commun**, 2009 ; Fujiwara, **PLoS One**, 2011) (collaboration with Department of Cardiac Surgery, and Department of Medicine and Clinical Science, Kyoto University Graduate School of Medicine)
- 5) Cardiovascular cell differentiation using human ES cells  
Our human ES cell research project "Research for differentiation mechanisms of cardiovascular cell differentiation using human ES cells" has been approved by the Science Ministry of Japan (2005.3.10).
- 6) Cardiovascular regeneration with iPS cell research
  - i) Establishment of cardiovascular cell differentiation system of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008 ; **Best Paper Award** in Basic Science category, *Circulation* 2008).
  - ii) Novel efficient cardiomyocyte induction and purification method with VCAM1 (Uosaki, **PLoS One**, 2011)
  - iii) Cell sheet transplantation strategies with iPS cell-derived cardiac cell population. (Masumoto, **Stem Cells**, 2012) (Collaboration with Tokyo Women's Medical University)
  - iv) Induction and purification of cardiac progenitors from human iPS cells
- 7) Application of iPS cell differentiation system to chemical biology and drug screening (Nakao, **Bioorg Med Chem Lett**, 2008) (Collaboration with Waseda University)
- 8) Screening and identification of small molecules for cardiomyocyte differentiation and proliferation

## 【業績目録】

## ◆ 誌上発表 ◆

## 原著論文

(\*corresponding author)

- Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Kataoka H, Takayama N, Eto K, Nishikawa SI, Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Takahashi A, Hara E, Imai H, Shinkai Y, Yamashita JK\*. Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a. **Cell Stem Cell**, 10: 759-770, 2012
- Masumoto H, Matsuo T, Yamamizu K, Uosaki H, Narazaki G, Katayama S, Marui A, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK\*. Pluripotent stem cell-engineered cell sheets re-assembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function with cardiomyocyte-mediated neovascularization. **Stem Cells**, 30: 1196-1205, 2012
- Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Kataoka H, Takayama N, Eto K, Nishikawa SI, Yamashita JK\*. PKA/CREB signaling triggers initiation of endothelial and hematopoietic cell differentiation via Etv2 induction. **Stem Cells**, 30: 687-696, 2012
- Matsuura K, Wada M, Konishi K, Sato M, Iwamoto U, Sato Y, Tachibana A, Kikuchi T, Iwamiya T, Shimizu T, Yamashita JK\*, Yamato M, Hagiwara N, Okano T. Fabrication of mouse embryonic stem cell-derived layered cardiac cell sheets using a bioreactor culture system. **PLoS One**, 7: e52176, 2012
- Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Suzuki T, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK, Okano H, Narita M. Multiple analyses of G-protein coupled receptor (GPCR) expression in the development of gefitinib-resistance in transforming non-small-cell lung cancer. **PLoS One**, 7: e44368, 2012
- Kuzumaki N, Suzuki A, Narita M, Hosoya T, Nagasawa A, Imai S, Yamamizu K, Morita H, Nagase H, Okada Y, Okano HJ, Yamashita JK\*, Okano H, Suzuki T, Narita M. Effect of  $\kappa$ -opioid receptor agonist on the growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Br J Cancer**, 106: 1148-1152, 2012

## 英文総説

- Masumoto H, Sakata R. Cardiovascular surgery for realization of regenerative medicine. **Gen Thorac Cardiovasc Surg**, 60: 744-755, 2012
- Masumoto H, Yamashita JK\*. Strategies in cell therapy for cardiac regeneration. **Inflammation Regenerat**, in press.

## 和文総説

- 山下 潤. 「低分子化合物による ES/iPS 細胞由来心筋細胞の分化・増殖制御」, 循環器内科・特集「心筋再生医療の最前線」, 71: p338-345, 2012. 科学評論社
- 山下 潤. 「多能性幹細胞を用いた心臓再生 創薬アプローチを中心に」, ファルマシア, 48: p847-851, 2012. 日本薬学会
- 山下 潤. 「血管の発生と分化メカニズム」, 血管医学 Vol.13/No.4: p77-84, 2012. メディカルレビュー社

升本英利, 山下 潤, 「純化心血管系細胞の再構成による多能性幹細胞由来細胞シートは心筋細胞を介する血管新生により梗塞心の機能を回復させる」, Vol.11/No.4: p56-62, 2012. 日本再生医療学会

---

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Imai H, Shinkai Y, Yamashita JK. Differentiation velocity is determined by protein kinase A through epigenetic regulation with G9a. 2012 Keystone Symposia; Epigenomics / Chromatin Dynamics. 2012.1.17-22. Colorado, USA.
- 升本英利. Therapeutic potential and mechanisms of tissue sheets re-assembled with defined cardiovascular populations from pluripotent stem cells. 第9回心血管幹細胞研究会. 2012.1.13. 東京
- Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Takahashi A, Hara E, Imai H, Shinkai Y, Yamashita JK. Protein kinase A determines early differentiation timing through epigenetic regulation with G9a. The 1<sup>st</sup> Retreat of Center for iPS Cell Research and Application (CiRA). 2012.2.24. Otsu, Japan. 'Best Poster Award'
- 升本英利. Generation of Cardiac Tissue Sheets Fully Engineered with Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiovascular Cell Populations. 第76回日本循環器学会学術集会. 2012.3.16. 福岡
- 松永太一. cAMP/PKA signaling を介した RSK4 による内皮細胞分化制御機構. 第49回日本臨床分子医学会学術集会. 2012.4.13. 京都
- 松永太一. RSK4 による cAMP/PKA シグナルを介した新しい内皮細胞分化制御機構. 第85回日本内分泌学会学術総会. 2012.4.20. 名古屋
- Matsunaga T. RSK4 regulates endothelial differentiation through suppression of cAMP/PKA-mediated Flk1 induction (poster). 17th International Vascular Biology Meeting. 2012.6.4. Wiesbaden, Germany. 'Travel Award'
- 升本英利. Mouse and human pluripotent stem cell-engineered cell sheets re-assembled with defined cardiovascular populations ameliorate reduction in infarct heart function through cardiomyocyte-mediated neovascularization. 第11回日本再生医療学会. 2012.6.12. 横浜 'YIA 受賞者講演・最優秀賞受賞(基礎研究部門)'
- 福島弘之. 多能性幹細胞を用いた新規心筋分化誘導低分子化合物の探索・同定. 第11回日本再生医療学会. 2012.6.12-14. 横浜
- 升本英利. ラット心筋梗塞モデルへのヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植による心機能回復効果. 第11回日本再生医療学会. 2012.6.14. 横浜
- Masumoto H. Human Induced Pluripotent Stem Cell-engineered Tissue Sheets with Defined Cardiovascular Cell Populations Ameliorate Function after Myocardial Infarction (poster). ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 10th Annual Meeting. 2012.6.15. Yokohama, Japan.
- Fukushima H. Novel chemicals potently inducing cardiomyocytes from various progenitor populations (poster). ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 10th Annual Meeting. 2012.6.14-16. Yokohama, Japan.
- 升本英利. ヒト iPS 細胞由来心臓組織シート移植による亜急性期虚血性心疾患治療の可能性についての基礎的検討 (ポスター). 第33回日本炎症・再生医学会. 2012.7.5. 福岡 '最優秀ポスター賞受賞'
- 松永太一. RSK4 regulates endothelial differentiation via inhibition of cAMP/PKA-mediated Flk1 induction. 第

33 回日本炎症・再生医学会. 2012.7.5. 福岡

- 松永太一. RSK4 is a novel negative regulator of endothelial differentiation via direct suppression of cAMP/PKA signaling. 第10回メタボリックシンドロームカンファレンス. 2012.7.14. 京都 ‘若手研究奨励賞’
- Matsunaga T. RSK4 Is a Novel Negative Regulator of Endothelial Differentiation via Direct Suppression of Protein Kinase A Activity (poster). BCVS (Basic Cardiovascular Sciences) 2012 Scientific Sessions, AHA (American Heart Association). 2012.7.23. New Orleans, USA.
- Masumoto H. Transplantation of Cardiac Tissue Sheets Including Defined Cardiovascular Cell Populations Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells Ameliorates Cardiac Dysfunction after Subacute Myocardial Infarction (poster). BCVS (Basic Cardiovascular Sciences) 2012 Scientific Sessions, AHA (American Heart Association). 2012.7.25. New Orleans, USA.
- Masumoto H. Transplantation of cardiac tissue sheets including human induced pluripotent stem cell-derived defined cardiovascular cell populations ameliorates cardiac function after myocardial infarction (poster). ESC (European Society of Cardiology) Congress. 2012.8.27. Munich, Germany.
- 松永太一. 血管内皮分化における RSK4 の役割. 第3回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2012.9.8. 小樽 ‘ポスター優秀賞’
- 福島弘之. Novel chemicals potently induce cardiomyocyte differentiation from various progenitor populations. 第3回 Molecular Cardiovascular Conference II. 2012.9.7-9. 小樽
- 升本英利. ヒト iPS 細胞から分化誘導した心臓構成細胞を含む細胞シート移植による重急性期虚血性心疾患治療についての基礎的検討. 第65回日本胸部外科学会. 2012.10.19. 福岡
- Masumoto H. A basic study of cell sheet transplantation for infarcted hearts using human iPS cell-derived cardiomyocytes and vascular cells. International Society for Heart Research, 29th Annual Meeting Symposium. 2012.10.27. Fukuoka, Japan.
- Masumoto H. Transplantation of Cell Sheets with Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes and Vascular Cells for Infarcted Hearts: A Basic Study (poster). AHA (American Heart Association) Scientific Sessions 2012. 2012.11.5. Los Angeles, USA.
- 福島弘之. 新規低分子化合物を用いた新しい心臓再生治療戦略の開発. 第16回日本心血管内分泌代謝学会. 2012.11.23-24. 東京 ‘YIA 受賞’
- 松永太一. RSK4 is a novel regulator of endothelial cells differentiation through direct inhibition of Protein kinase A activity. 第20回日本血管生物医学会学術大会. 2012.12.6. 徳島

## 2) 講演・シンポジウム

- 山下 潤. ES/iPS 細胞を用いた心血管再生への多面的アプローチ. The 4th Meeting of Molecular Cardiology Seminar 23 (MCS23). 2012.2.28. 千葉
- 山下 潤. ES 細胞・iPS 細胞を用いた心臓血管再生への挑戦. 第24回下西集談会(下京西部医師会). 2012.3.3. 京都
- 山下 潤. ES・iPS 細胞を用いた心血管分化再生－ケミカルバイオロジー的アプローチを中心に－. 日本薬理学会シンポジウム. 2012.3.15. 京都
- 山下 潤. iPS 細胞を用いた心血管再生治療の試み. 第49回日本臨床分子医学会・シンポジウム「血管制御と



疾患治療への応用」. 2012.4.13. 京都

○山下 潤. Diverse roles of protein kinase A signaling in early stage endothelial cell differentiation (Oral presentation). 17th International Vascular Biology Meeting. 2012.6. 4. Wiesbaden, Germany. 'The highest scored abstract'

○山下 潤. 細胞と創薬幹細胞分化系を用いた多面的心臓再生の試み. 第2回心臓先端医療研究会. 2012.6.8. 大阪

○升本英利. iPS細胞による心臓再生研究～いま心臓外科医にできること～. 第12回比叡山ワークショップ. 2012.6.9. 京都. '口演・最優秀賞受賞(基礎研究部門)'

○山下 潤. 新しい心血管再生治療戦略開発に向けた多面的アプローチ. 第11回日本再生医療学会パネルディスカッション. 2012.6.12. 横浜

○福島弘之. Novel small molecules potently induce cardiomyocytes from various progenitor populations 第33回日本炎症・再生医学会. 2012.7.5-6. 福岡 '一般演題からシンポジウムへ採択'

○山下 潤. ES/iPS細胞の心血管再生への応用. 第48回日本小児循環器学会シンポジウム. 2012.7.6. 京都

○山下 潤. ES/iPS細胞を用いた多面的心血管再生治療戦略. 京都大学医学部付属病院・iPS細胞再生医学研究会. 2012.7.20. 京都

○山下 潤. 多能性幹細胞を用いた心血管再生への多面的アプローチ. 第49回生物医工学サロン. 2012.7.23. 京都

○山下 潤. 多能性幹細胞を用いた心血管再生への多面的アプローチ. 臨床医科学フォーラム. 2012.9.15. 京都 '臨床病態医科学特別賞受賞講演'

○山下 潤. 多能性幹細胞を用いた心血管再生への多面的アプローチ. CiRA mini Symposium. 2012.10.10. 京都

○Yamashita JK. Differentiation Stage-specific Roles of Protein Kinase A Signaling in Endothelial Cell Lineages. 2012 KAIST Mini-symposium. Stem cells and Vascular Biology. 2012.10.22. Daejeon. Korea.

○Yamashita JK. Multiple and integrative approaches to cardiac regeneration with pluripotent stem cell research. International Society for Heart Research, 29th Annual Meeting Symposium. 2012.10.27. Fukuoka, Japan.

○山下 潤. A novel signaling-epigenetic linkage regulating stem cell "differentiation timing" from pluripotent state to ectoderm, endoderm, and mesoderm lineages. 新学術領域 Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012. 2012.11.12. 奈良

○Yamashita JK. Fate determination processes of endothelial lineages regulated by protein kinase A signaling in Pluripotent stem cell differentiation. Japan-Korea Joint Symposium of Vascular Biology. 2012.12.6. Tokushima, Japan.

○升本英利. Efficient differentiation of human iPS cells toward cardiovascular cell populations to generate bioengineered cardiac tissue-like cell sheets: a strategy for cardiac regeneration. 第35回日本分子生物学会年会. 2012.12.11. 福岡

## 幹細胞加工研究分野 Department of Stem Cell Engineering

分野主任 准教授 多田 高

Assoc. Prof. Takashi Tada

### 【研究概要】

#### 背景)

受精から始まる個体発生は、たった一個の細胞の細胞分裂による数十兆個への増殖と共に、巧妙に制御された細胞分化によってもたらされる。この過程で、受精卵は、体を形つくる全ての種類の細胞に分化可能な多能性が失われ、限られた役割を果たすべく特殊化した細胞へと分化そして老化してゆく。一般に、分化は後戻りのできないプロセスとの概念が固定されていた。我々は、多能性幹細胞(pluripotent stem cell)の一種である胚性幹(ES)細胞と体細胞を細胞融合すると、体細胞核ゲノムのエピジェネティクスが書き換えられ未分化細胞様に再プログラム化されることを世界に先駆けて発見した(Tada et al. (2001) Curr. Biol.)。この結果は、分化細胞を直接培養条件下で多能性幹細胞に再プログラム化可能であること、また ES 細胞には体細胞の再プログラム化に必要な十分な因子があることを示していた。現在では、ES 細胞から同定された因子(Oct4, Sox2, Klf4 & c-Myc)の強制発現により体細胞が多能性幹細胞(人工多能性幹(iPS; induced pluripotent stem)細胞)に再プログラム化されることが明らかになっている(Takahashi & Yamanaka (2006) Cell)。体細胞の多分化能の獲得には Oct4, Sox2, Nanog が鍵となる転写因子として考えられているが、再プログラム化機構は未だ解き明かされていない。

#### 目的)

- 1) 体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化されるメカニズム
- 2) 再プログラム化に関わる因子の働き
- 3) 再プログラム化の医学応用技術の開発

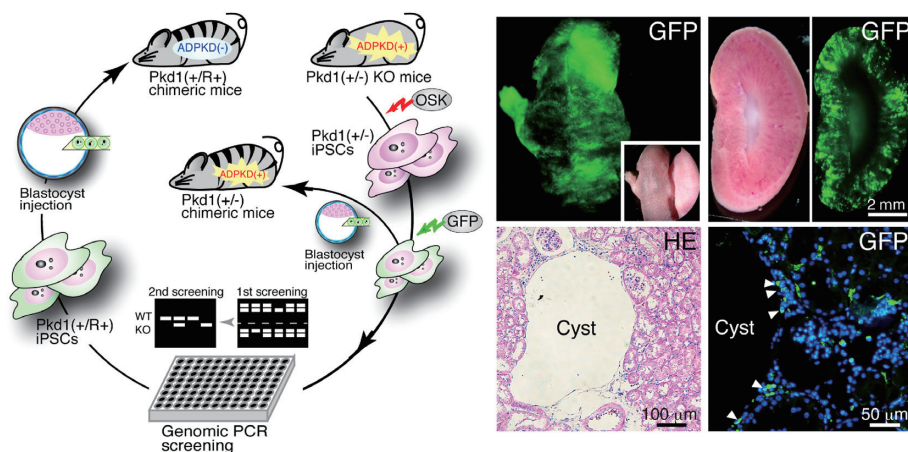


図 1 常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)モデルマウス由来の疾患 iPS 細胞の遺伝的異常修復

## 重要性)

基礎生物学の観点から、再プログラム化メカニズムは、生命を次世代につなぐ仕組みを解き明かすための鍵となる。一方、医学応用の観点から、再プログラム化による個人体細胞からの多能性幹細胞の作製成功は、拒絶反応を伴わない移植分化細胞の医療応用の扉を開き、再生医療の現実性を高める大きな一歩である。医療応用に向けて、解決しなければならない問題に焦点を絞り、一步一步クリアーすることで基礎研究の社会への貢献が実現できる。

## Background)

Our body is built by an incredible variety of cell and tissue types, which develop from a single fertilized egg through embryogenesis. Determination of the cell fate is epigenetically regulated through activation or repression of specific genes. Nuclear reprogramming is a phenomenon that a specialized somatic cell acquires pluripotential competence, which is defined by multi-lineage differentiation, due to reset of epigenetic memory of the somatic cell. We found that embryonic stem (ES) cells, which have the robust capability of self-renewal with pluripotency under culture conditions, retain the nuclear reprogramming activity as shown by cell fusion with a somatic cell (Tada et al. (2001) Curr.Biol.). These findings have indicated the reality of direct reprogramming of somatic cell under a culture condition with factors isolated from ES cells. Tremendously, it has been discovered that defined factors Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc highly expressed in ES cells are sufficient for triggering nuclear reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem (iPS) cells (Takahashi and Yamanaka (2006) Cell). It has been shown that Oct4, Sox2 and Nanog cooperatively function as key transcription regulators in the repression of somatic cell genes and the activation of stem cell genes in pluripotent stem cells.

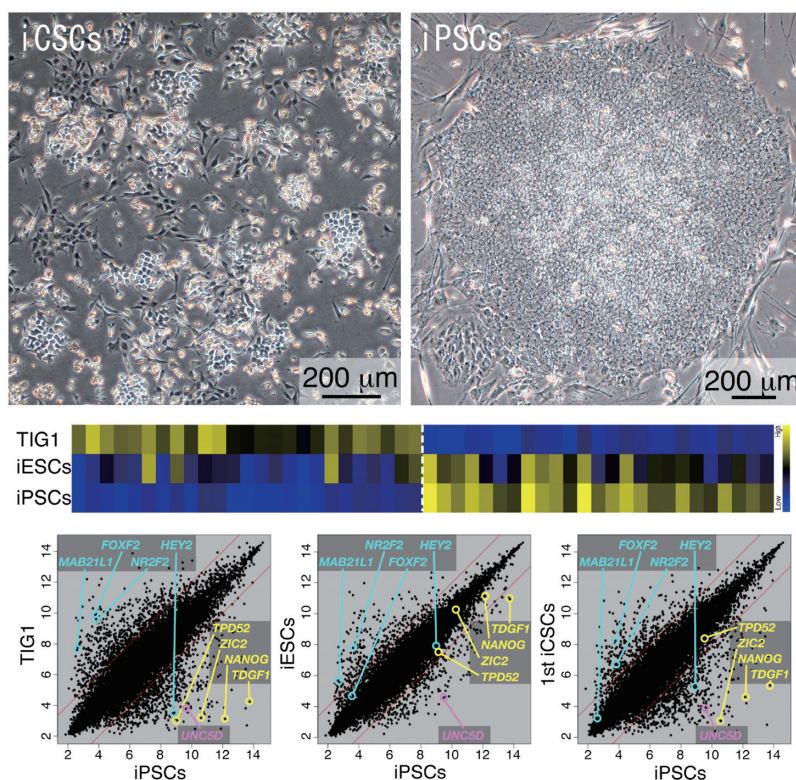


図2 ヒト体細胞から再プログラム化された iPS 細胞と iCS 細胞での遺伝子発現  
TIG1 ; 体細胞, iESC 上皮系幹細胞, iCSC ; 癌幹様細胞, iPSC ; iPS 細胞

Reprogrammed somatic genome through cell fusion with ES cells function in cell differentiation similar to the ES genome. Comparative analyses of epigenetic modifications of the somatic genome before and after cell fusion with ES cells demonstrated that the nuclear reprogramming is induced at least through two steps; a) erasure of the somatic cell memory accompanied with global chromatin de-condensation and b) acquirement of the pluripotent stem cell memory. However, the pathway from somatic cell to pluripotent stem cell is largely unknown.

#### Aims)

- 1) Understanding of molecular mechanisms involved in nuclear reprogramming of somatic cells
- 2) Understanding of molecular function of stem cell factors in maintaining pluripotency and self-renewal
- 3) Development of nuclear reprogramming technologies toward clinical applications

#### Importance)

In the field of basic stem cell biology, understanding of the molecular mechanisms of nuclear reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells will shed light on the central dogma, the succession of life. In the field of regenerative medicine, the reality of personal iPS cells from individual somatic cells through nuclear reprogramming rises the great hopes on regenerative medicine in near future. Toward realizing the regenerative medicine, further study will be required to overcome several ethical and practical obstacles.

### 【業績目録】

#### ◆ 誌上発表 ◆

##### 1) 原著論文

- Nagata, S., Hirano, K., Sun, L.T., Tada, T.: Self-renewal and pluripotency acquired through somatic reprogramming to human cancer stem cells. *PLoS One* **7**: e48699 (2012)
- Okamura, D., Mochizuki, K., Taniguchi, H., Tokitake, Y., Ikeda, M., Yamada, Y., Tournier, C., Yamaguchi, S., Tada, T., Scholer, H.R., Matsui, Y.: REST and its downstream molecule Mek5 regulate survival of primordial germ cells. *Developmental Biology* **372**: 190-202 (2012)
- Takehashi, M., Tada, M., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., Kazuki, Y., Oshimura, M., Tada, T., Shinohara, T.: Hybridization of testis-derived stem cells with somatic and embryonic stem cells. *Biology of Reproduction* **86**: e178, 1-9 (2012)
- Cheng, L.T., Sun, L.T., Tada, T.: Genome editing in induced pluripotent stem cells. *Genes to Cells* **17**: 431-438 (2012)
- Cheng, L.T., Nagata, S., Hirano, K., Yamaguchi, S., Horie, S., Ainscough, J., Tada, T.: Cure of ADPKD by selection for spontaneous genetic repair events in Pkd1-mutated iPS cells. *PLoS One* **7**: e32018 (2012)
- Hirano, K., Nagata, S., Yamaguchi, S., Nakagawa, M., Okita, K., Kotera, H., Ainscough, J., Tada, T.: Human and mouse induced pluripotent stem cells are differentially reprogrammed in response to kinase inhibitors. *Stem Cells Dev.* **21**: 1287-1298 (2012)

## 2) 著 書

多田 高：遠くて近いノーベル賞,「2012 年ノーベル賞記念フォーラム」30 巻(19 号): 3081-3083(羊土社, 東京 2012)

Tada, T., Surani, M.A.: Epigenetic reprogramming of somatic nuclei via cell fusion.

In “Principle of Cloning, 2<sup>nd</sup> edition” ed. by Jose Cibelli et al.(Academic Press, USA): in press(2012)

Hirano, K., Sun, L.T., Tada, T.: Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells. In “Principle of Cloning, 2<sup>nd</sup> edition” ed. by Jose Cibelli et al.(Academic Press, USA): in press(2012)

多田 高：ヒトとマウス iPS 細胞の共通点と相違点,「再生医療を実現化する幹細胞のメディカルサイエンス」(梅澤明弘, 笹井芳樹, 洪 実 編集)30 巻(10 号): 36-41(羊土社, 東京 2012)

多田 高：多能性幹細胞,「DOJIN BIOSCIENCE シリーズ『エピジェネティクス』」(田嶋正二 編集)  
in press(化学同人, 京都 2012)

多田 高：幹細胞の染色体・細胞核,「DOJIN BIOSCIENCE シリーズ『染色体の細胞核のダイナミクス』」  
(平岡 泰・原口徳子 編集)in press(化学同人, 京都 2012)

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

Shogo Nagata, Kunio Hirano, Kanemori Michele, Liang-Tso Sun, Takashi Tada: Self-renewal and pluripotency acquired through somatic reprogramming to human cancer stem cell :「第 35 回日本分子生物学会年会」  
(2012.12.11-13, 福岡)

Liang-Tso Sun, Shinpei Yamaguchi, Takashi Tada: Function and expression regulation of Nanog in mouse blast :  
「特定領域研究－生殖細胞の世代サイクルとエピゲノムネットワーク公開シンポジウム」  
(2012.11.21-22, 京都)

### 2) 講演・シンポジウム

多田 高：マウス iPS 細胞を用いた常染色体優性多発性嚢胞腎の治療モデル :「第 12 回 PKD 研究会特別講演」  
(2012.12. 01, 東京)

多田 高：幹細胞とリプログラミング :「産業医科大学大学院セミナー」(2012.11.14, 小倉)

多田 高：マウス iPS 細胞を用いた常染色体優性多発性嚢胞腎の治療モデル :「第 55 回日本腎臓学会総会  
ミニレクチャー」(2012.06.02, 横浜)

多田 高：体細胞から多能性幹細胞へ : ゲノム再プログラム化の仕組みと応用「産業医科大学セミナー」(2012.03.09,  
小倉)

多田 高：X 染色体の不活性化とゲノム再プログラム化 : 「哺乳類の X 染色体不活性化研究会」(2012.02.23-24,  
札幌)



## 附属再生実験動物施設

### Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 長澤 丘司

*Acting Head, Prof. Takashi Nagasawa*

専任教員・准教授 近藤 玄

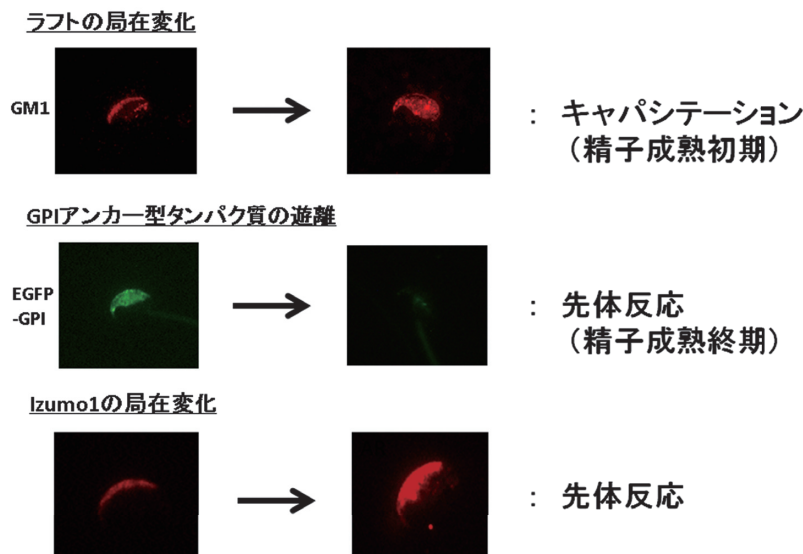
*Laboratory Manager, Assoc. Prof. Gen Kondoh*

#### 【再生実験動物施設の現状について】

附属再生実験動物施設では、平成 23 年度イヌ：137 頭、サル：4 頭、ウサギ：33 羽、ラット：67 匹、マウス：8,712 匹が実験動物として飼養された（京都大学動物実験委員会「動物実験に関する自己点検・評価報告書」平成 24 年 7 月版による）。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任准教授 1 名・技術職員 3 名・非常勤職員 15 名で行っている。

当研究所で動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分の理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、動物実験実施にあたっての原則、実験動物の取り扱い方等についての全学講習および所内講習を受講することが義務付けられている。南部総合研究実験棟・動物飼育室を利用する者は、これに加えて、SPF (Specific Pathogen Free) マウスの取り扱いについて実地講習を受けなければならない。また、動物実験を実施するには、動物実験計画書を当研究所の動物実験委員会に提出し、厳格な審査を受け承認を得ることが必要である。

南部総合研究実験棟(2002 年 12 月設置、再生医科学研究所、ウイルス研究所、医学部の 3 部局による共同研究実験棟)マウス飼育室は稼動を開始してから 7 年が経過した。現在、SPF マウス飼育室全 16 室中、再生研：11 室、ウイルス研：4 室、医学部：1 室、を使用している。本マウス飼育棟では SPF マウスのみが飼育され、動物実験が行われている。搬入できるマウスは、指定実験動物供給業者から購入可能な SPF マウス及び当施設等において体外受精・受精卵移植によるクリーンアップを受け SPF 化されたマウスのみ限定されている。また、飼育室に持ち込む生物試料(細胞・血清等)も、事前に当施設による検疫を受けることが義務付けられた。これらの厳格な管理の下、現在までのところ、感染事故等の深刻な問題は起きていない。ただ、共同実験棟マウス飼育室においては、SPF マウスの微生物汚染を防止するためには、動物飼育員、利用者各人の十分な注意が必要であるが、多数の人間が出入りする以上、いつ何時汚染事故が生じるかしのれない。不幸にして、幾つかの他校動物実験施設で微生物汚染事故が発生したことが報告されている。それらの苦い経験から、SPF マウスの微生物汚染の発生原因、汚染拡大様式、汚染除去法などを十分に学び、万一汚染が生じた時のことも想定し、汚染を最小限度に封じ込める等の対策について、本動物施設でも予め具体的な方策を立てておくことが必要であろう。一方、稼働し始めて明らかとなってきた設計、建築、設備上の種々の問題点、すなわち、室温・風量制御、凍結防止対策の不備等も徐々に把握されつつあり、対応可能になってきた。また、施設運営に関しても、3 部局共同の建物であるため、当初、運営・予算の執行における困難さが指摘されてきたが、試行錯誤ながらも克服されつつある。ただ、独立法人化後の運営交付金の削減により、安定した施設運営が困難になりつつあり、このような恒常的施設運営のための別枠の予算措置が講じられることを期待するものである。

H. Watanabe & G. Kondoh *J. Cell Sci.*, 2011より改変

精子成熟にともなう精子膜反応。精子は精巣で産生された直後には受精能はないが、雄や雌の生殖路内を通過する間に様々な分子修飾を受けて、受精能を獲得する。これまでの研究で、我々は、精子成熟と相関して、1. 初期過程であるキャパシテーションにともなうラフトの局在変化がおこる、2. 終期過程である先体反応にともなう GPI アンカー型タンパク質遊離および Izumo1 の局在変化がおこる、ことを見出し、この一連の反応を精子膜反応 (sperm membrane reaction) と呼んでいる。精子膜反応をおこした精子のみが受精することができる。

東館動物施設は、副施設長による管理のもと、時代の要請に適合した飼育施設に変貌しつつある。すなわち、指紋認証制による利用者登録の導入、サル飼育室の改良、遺伝子改変動物飼育に適合したマウス・ラット室の改造等である。また、イヌについても、飼育数と出入の厳密なる把握により、スムーズな登録と狂犬病予防注射が可能になった。しかしながら、施設・備品の老朽化が進行しつつあり、問題発生時に、まさに自転車操業的に対応しているのが現状である。また、毎年度予算的にも逼迫しており、このような対応がいつまで続けられるか予測不能である。今後は、大規模な改装を念頭においた施設運営が望まれる。

## 【研究概要】

再生実験動物施設は、再生医科学研究所の附属施設として、研究実施に不可欠である動物実験に関する全般的な管理業務(再生研の動物実験計画書の審査に関係する業務、動物実験に関する講習会の開催、再生研における実験動物の維持、管理など)と共に、一研究分野として以下の研究活動を行っている。

### 研究テーマ 1. GPI アンカー型タンパク質の代謝メカニズムと受精

現在の当研究室のメインテーマは、膜結合タンパク質の一種であるグリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型タンパク質 (GPI-AP) の代謝メカニズムの解明とその生殖細胞系列での生物学的意義の探究である。このため、まず、個体内での GPI-AP の局在を網羅的に解析するために、GPI アンカー型 GFP レポーター蛋白質 (EGFP-GPI) を構築した。これを導入したトランスジェニックマウスでは、予想以上に EGFP-GPI が、外分泌腺や精巣において遊離していることを見出した (Kondoh G. et al. *FEBS lett.* 458, 299-303, 1999)。

以後、この現象に特に着目し、マウス精巣生殖細胞より GPI-AP 遊離因子の精製・構造解析を行った。その結果、この因子のひとつとしてアンギオテンシン変換酵素 (ACE) を単離した。すなわち、この酵素には、アンギオテン

シンIやブラディキニンなどの昇圧ペプチドの活性を制御するのみならず、多くの GPI-AP を細胞膜より遊離する新たな活性を持つことが明らかとなった。また、今回同定した活性は、ジペプチジルカルボキシペプチダーゼとしてこれらのペプチドを分解するための活性中心とは別の部位に位置し、また、GPI-AP のペプチド部分ではなく、GPI アンカーそのものを切断することも突き止めた。一方、ACE ノックアウトマウスでは、精子-透明体結合不全による雄性不妊が知られている。そこで、このマウスの精子をジペプチダーゼ不活性型 ACE で処理したところ受精能が回復した。このことから、ACE は in vivo で GPI-AP 遊離活性(GPIase)があり、この活性をもって受精に重要な役割を担っていることが示唆された(Kondoh G. et al. *Nat. Med.*, 11, 160-166, 2005)。また、GPI アンカーの生合成に関わる PGAP1 遺伝子ノックアウトマウスでも、ACE ノックアウトマウスと酷似の雄性不妊を示し、同じく精子膜上の GPI-AP が貯留傾向にある。これらのことから精子膜からの GPI-AP 遊離が精子の受精能獲得の重要なステップである可能性が示唆された。

そこで、この過程を追跡する GPI アンカー型 GFP(EGFP-GPI)Tg マウスを用い、精子における GPI-AP 遊離と受精能獲得との相関を詳細に解析した。まず、精巢上体精子を採取し、精子成熟を誘導する methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD)を含む培養液で培養したところ、時間経過とともに蛍光の減衰が見られた。また、Hyal5, Prss21 などの内在性 GPI-AP も顕著に遊離した。このとき同時にラフトマーカである GM1 の局在を蛍光標識したコレラトキシン(CTB)で染色したところ、精子頭部膜ラフトの特異的な局在変化が見られた。M- $\beta$ -CD 単独処理ではこれらの変化は見られたが、もうひとつの精子成熟誘導試薬である BSA 単独では有意な変化が見られなかった。そこで BSA に加えカルシウムイオノフォア処理することで強制的に先体反応を促進したところ、上記精子膜変化が顕著に見られた。これらのことから精子膜変化は先体反応に伴って起こることが示唆された。また、M- $\beta$ -CD 処理群につき Izumol の局在変化を指標に先体反応が起こっているかを調べたところ、有意な先体反応が観察された。すなわち、M- $\beta$ -CD は従来から言われている capacitation 誘導に加えて先体反応も促進することがわかった。我々は、上記精子膜変化に先体反応を加えて一連の現象を精子膜反応(sperm membrane reaction, SMR)と呼称し、射出精子での解析を行った。その結果、SMR は子宮内精子ではほとんど見られなかったが、卵管内遊走精子の約 40%、卵丘細胞層侵入精子の約 70%、また透明帯接着精子の全てで観察され、SMR は卵管内で階層的に起こることが示唆された(Watanabe H. and G. Kondoh *J. Cell Sci.*, 124, 2573-2581, 2011)。次に、これらの変化を誘導する生体内因子を同定するため、3 条件(1. 発情未交配, 2. 精管結紮雄マウスと交配, 3. 正常雄マウスと交配)の雌から子宮卵管移行部組織を採取し、マイクロアレイ比較解析を行った。条件 2 と条件 3 の違いは、条件 3 では精子および精巢上体分泌物による刺激が加わることにある。そこでこれらの間の遺伝子発現プロファイルと比較すると、210 個の遺伝子が 3>2 の発現上昇を示した。さらに構造的に分泌型もしくは膜結合型タンパク質をコードするものを選び出した。現在、その中からひとつの仮称 Sperm Maturation Factor of Female(SMF-F)候補遺伝子に着目して解析を進めている。

## 研究テーマ 2. 遺伝子改変マウス作出技術の簡易化

遺伝子改変マウスの作出には、何段階ものプロセスが存在し、多くの時間・労力・経費を必要とする。なかでも特に問題になるのが、ターゲティングベクターの作製、ES 細胞の培養そしてキメラマウス作出の諸段階であろう。我々は、これらのステップにおける“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきた。ターゲティングベクターの作製においては、BAC クローンに基づく大腸菌内組み換えシステム(リコンビネーリング)を採用し、従来に比べて四分の一の時間短縮に成功した。また、キメラマウスの作出においては、凝集法を改良し、高価なインジェクション機器の購入や煩雑なメンテナンスのいらぬ方法を可能にした(Kondoh G. et al. *J. Biochem. Bio-*

*phy. Methods.*, *Methods.*, 39, 137-142, 1999). これらの技術集約のもとに、過去8年間で8報の論文発表に、遺伝子改変マウス作出担当として参加した。

Mammalian sperm undergo multiple maturation steps after leaving testis to be competent for fertilization. Serial important changes occur in the female reproductive tract on sperm, although the molecular mechanisms underlying these processes remain unclear. To investigate the sperm membrane remodeling upon sperm maturation, we developed transgenic mouse lines carrying glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored enhanced green fluorescent protein (EGFP-GPI) and traced the fate of this fluorescent protein during the fertility acquiring sperm process *in vitro* and *in vivo*. When the green-fluorescent sperm were treated with compounds for promoting acrosome reaction, EGFP-GPI was released from the sperm surface cross-linked with characteristic relocation of a lipid raft marker ganglioside GM1. Sperm ejaculated into the uterus strongly expressed EGFP-GPI in the head region, while a part of the oviductal sperm lost fluorescence in an angiotensin-converting enzyme (ACE)-dependent manner. Moreover, the sperm on the zona pellucida of eggs in the oviduct were found to be exclusively GFP low. These results suggested that sperm undergoing GPI-AP release associated with reorganization of lipid raft and acrosome reaction acquire fertilization potential.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 原著論文

- Masago Y., A. Hosoya, K. Kawasaki, S. Kawano, A. Nasu, J. Toguchida, K. Fujita, H. Nakamura, **G. Kondoh**, and K. Nagata. Molecular chaperone Hsp47 is essential for cartilage and endochondral bone formation. *J. Cell Sci.*, 125(5), 1118-1128(2012).
- Ishimura, A., K-I. Minehata, M. Terashima, **G. Kondoh**, T. Hara, and T. Suzuki. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of Cdkn1a expression. *Development*, 139, 749-759(2012).
- Orihashi, K., H. Tojo, K. Okawa, Y. Tashima, T. Morita, and **G. Kondoh**. Mammalian carboxylesterase (CES) releases GPI-anchored proteins from the cell surface upon lipid raft fluidization. *Biol. Chem.*, 393, 169-176, (2012).

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 学会・研究会発表

- 近藤 玄, 渡邊仁美, 竹尾 透, 中潟直己 マウス雌生殖器官内における精子膜変化と受精能獲得 第57回日本生殖医学会学術講演会・総会 2012, 長崎市.
- 渡邊仁美, 竹尾 透, 東城博雅, 中潟直己, Tak W. Mak, 近藤 玄: 自然免疫因子リポカリン2は細胞膜リン脂質フォスファチジルエタノールアミンに結合し、雌生殖路内で精子成熟を促進する 第116回関西実験動物研究会 2012, 京都市.

(文責: 近藤 玄)



# 附属ナノ再生医工学研究センター Research Center for Nano Medical Engineering

## ナノバイオプロセス研究領域 Department of Nano Bioprocess

分野主任 教授 楠見 明弘

*Prof. Akihiro Kusumi*

### 【研究概要】

#### 1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitro での1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、それらの分子の活性化(反応)までも1分子毎に見る方法を開発してきた(これらは世界でも我々のみ)。これは、ナノサイエンス／ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

#### 2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体(連続体)と考えられてきた。しかし、私達は、(1)細胞膜はコンパートメント化されていること、(2)これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3)その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー－ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

さらに最近、電子線トモグラフィー法を用いて、細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化することに成功した。細胞膜試料として、細胞膜の内側表面を急速凍結ディープエッチ白金レプリカに写し取ったものを用いた。これによって、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めたところ、それが、膜分子の拡散によって得られたコンパートメントの大きさとピッタリと一致した(図1参照)。

受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが(シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する)、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによることがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

#### 3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。



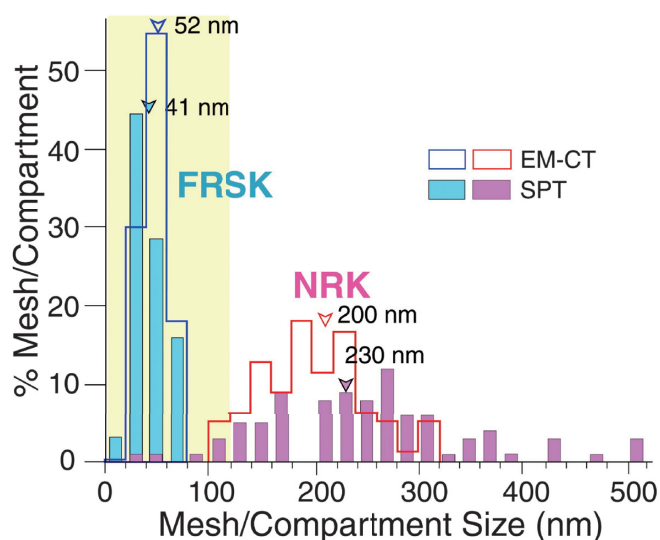


図 1

細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤がNRK細胞、青が、FRSK細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく1秒以下の寿命で分解(不活化)する、ことを見いだした(Ras-Rafの系、ラフトの関与する系)。すなわち、1回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパルス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

### [Summary of Research]

#### Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004; Kusumi et al., 2005; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized, structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Kusumi et al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averag-

ing over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

### Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in preparation).

### Detection of transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labelled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

### Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET ; Murakoshi et al., 2004 ; Kusumi and Murakoshi, 2005). Activation of H-Ras takes place only temporarily (<2 s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文・総説

- Z. Kalay, T. Fujiwara, and A. Kusumi. Confining domains lead to reaction bursts : reaction kinetics in the plasma membrane. PLoS One 7, e32948(2012).
- K.-J. Cho, R. S. Kasai, J.-H. Park, S. Chigurupati, S. J. Heidorn, D. van der Hoeven, S. J. Plowman, A. Kusumi, R. Marais, and J. F. Hancock. Raf inhibitors target Ras spatiotemporal dynamics. Curr. Biol. 22, 945-955(2012).
- A. C. E. Shibata, T. K. Fujiwara, L.-M. Chen, K. G. N. Suzuki, Y. Ishikawa, Y. L. Nemoto, Y. Miwa, R. Chadda, K. Naruse, and A. Kusumi. Archipelago architecture of the focal adhesion : Membrane molecules freely enter and exit from the focal adhesion zone. Cytoskeleton 69, 380-392(2012).
- K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. M. Hirose, Y. L. Nemoto, M. Ishibashi, Y. Miwa, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. Nat. Chem. Biol. 8, 774-783(2012).
- R. Sheng, Y. Chen, H. Y. Gee, E. Stec, H. R. Melowic, N. R. Blatner, M. P. Tun, Y. Kim, M. Källberg, T. K. Fujiwara, J. H. Hong, K. P. Kim, H. Lu, A. Kusumi, M. G. Lee, and W. Cho. Cholesterol modulates cell signaling and protein

networking by specifically interacting with PDZ domain-containing scaffold proteins. Nat. Commun. (2012)  
in press.

## 2) 和文総説

楠見明弘, 笠井倫志, 吉田謙太, 廣澤幸一朗, 藤原敬宏, 鈴木健一「シグナル伝達の1分子イメージング」実験医学  
増刊 30(5)「シグナル伝達研究最前線 2012」33-41(2012)

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 国際学会・外国の学会

#### 1A) 国外開催

- A. Kusumi. Signal transduction of GPI-anchored receptors based on dimerization and raft-lipid interaction. Boehringer Ingelheim Fonds International Titisee Conferences on Lipids As Organizers of Cell Membranes. Titisee on Schwarzwald, Germany. March 2012.
- A. Kusumi. Organizing principles of the plasma membrane: Three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking. CLS (Peking University)-iCeMS (Kyoto University) Joint Symposium. Peking, China. April 2012.
- A. Kusumi. Transient GPI-anchored protein homodimer rafts are basic units for raft organization and function. The Biophysical Society (U.S.) Thematic Meeting "Lipid-protein Interactions in Membranes: Implications for Health and Disease". Hyderabad, India. November 2012.

#### 1B) 国内開催

- A. Kusumi. Organizing principles of the plasma membrane: Three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking. Joint Summer Research School in Nanomedicine (jointly held by Keio University, RIKEN Brain Institute, Peking University, and Karolinska Institute). Tokyo, Japan, August 2012

### 2) 国外の大学・研究機関での招待講演

- A. Kusumi. National Centre for Biological Science. Bangalore, India. "Transient GPI-anchored protein homodimer rafts are basic units for raft organization and function: single-molecule imaging study." November 1, 2012.
- A. Kusumi. Department of Physiology, University of Otago, Dunedin, New Zealand. "Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: single-molecule tracking studies." November 26, 2012

### 3) 国内での招待講演

楠見明弘「動的ラフトを作る基本ユニットとシグナル変換促進機構: 1分子イメージングによる研究」文部科学省科学研究費補助金・新学術領域研究「修飾シグナル病」第2回公開シンポジウム「修飾シグナル病学術領域の創出」2012年1月28日 東京

楠見明弘「ラフト機能と構造の基本ユニット: 受容体ホモダイマーラフト…1分子イメージングによる研究」日本動

物細胞工学会 第27回動物細胞工学シンポジウム「細胞表面の理解と応用」2012年6月1日 東京  
楠見明弘「1分子毎に見て細胞膜がはたらく仕組みを解く」京都大学・再生医科学研究所 第7回公開講演会「分子から細胞さらに再生医療へ」2012年7月14日 京都  
楠見明弘「受容体ホモダイマーによるラフト機能創出：1分子イメージングによる研究」第21回日本バイオイメー  
ジング学会学術集会シンポジウム4「バイオイメーキングのフロンティア」2012年8月27日 京都  
楠見明弘「細胞膜の階層メゾドメイン構造とシグナル変換制御機構：1分子イメージングによる研究」第34回生体  
膜と薬物の相互作用シンポジウム(日本薬学会主催) 特別講演 2012年11月15日 京都  
楠見明弘「ラフト機能と構造の基本単位として働く GPI アンカー型受容体ホモダイマーラフト：1分子イメージング  
による研究」第31回日本分子生物学会年会ワークショップ1W5I「生体膜コンパートメントの形成と機能」  
2012年12月11日 福岡

## シミュレーション医工学研究領域 Department of Medical Simulation Engineering

准教授 玄 丞休

Assoc. Prof. Suong-Hyu Hyon

### 【研究概要】

本研究室では、生体組織と力学的に調和する生体材料や人工臓器の開発など生体機能の再生を目的とした診断・治療の支援を行うために、コンピュータ科学や材料工学の手法を用いて、以下のような基礎的ならびに応用的研究を行っている。

#### 1. 生体組織の力学的適応変形に関するシミュレーション

生体組織の力学的特性の解明を基本として、特に骨のモデリングならびにリモデリング現象など生体組織の力学的合理性の適応変形過程などについて数値シミュレーションを行っている。その結果、等応力分布あるいは等歪エネルギー密度分布などの制約関数に従って、各種骨組織の形態が形成されていることが示唆され、この制約の下に、生体組織と力学的に調和する人工関節等のインプラントのデザインの創生を試みている。（新エネルギー・産業技術総合開発機構助成金）

#### 2. 人工歯根周囲における歯根膜の再生

現在の人工歯根は、天然歯根のように歯根膜を持たず、直接顎骨に固定させるので、咀嚼時の動的荷重が緩衝されず直接顎骨に伝わる。その結果、歯槽骨に過大な応力が発生して骨吸収が起こり、ゆるみが生じる危険性が高い。そこで、チタン製人工歯根をポリマーで被覆し、表面処理により細胞接着性タンパク質であるコラーゲンを固定化し、さらにその上に歯根膜細胞を培養し、歯根膜ならびにセメント質の再生を図っている。（文部科学省科学研究費補助金）

#### 3. MR Elastography (MRE) による in vivo 弾性率データの計測、解析および検証

磁気共鳴弾性率計測法(MRE)は、MRIをベースとする新たな測定技術であり、これによる体内組織・器官の非侵襲性弾性率計測の手法を確立し、医療研究支援用の生体組織データベースを構築する。また触感デバイスを用いた人工現実感(VR)によるVRモデルシステムを開発している。（医学研究科情報学専攻との共同研究）

#### 4. 人工関節軟骨・人工椎間板などの医療用ハイドロゲル

関節軟骨が持つ優れた力学的特性を具備した人工関節軟骨材を開発することにより、関節の病変部のみを置換し健全な軟骨下骨梁を残す新しい人工関節軟骨の開発を目指している。当研究室にて新しく開発した高強度・高弾性率ポリビニルアルコールハイドロゲルは人工関節軟骨・椎間板材料として有望である。（医学研究科整形外科科学講座との共同研究、厚生労働省科研費）



## 5. 耐摩擦・摩耗特性に優れた人工関節用ポリエチレン

人工関節の摺動部に使用される超高分子量ポリエチレンの摩耗粉により発生する不良肉芽組織が骨吸収を惹起する異物反応が問題となっている。そこで、物理的な改良法により最終成形物に分子配向と結晶面配向を導入することにより、耐摩耗性の改良を試み、良好な結果が得られていた。本技術とライセンスは米国バイオメット社に移転され臨床応用された。

## 6. ポリフェノールによる細胞増殖制御と生体組織の長期間保存

緑茶ポリフェノール成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) が細胞・組織の保護作用を持つことを発見し、生体組織の保存に応用する研究を行っている。角膜に関しては、既存の角膜保存液は約 1 週間の保存期間であったが、EGCG を添加することにより 2 週間の保存期間でも上皮、内皮ともに形態、機能を維持することができる保存液を開発した(京都府立医科大学眼科教室共同研究)。

末梢神経を約 4 週間保存し、その後移植することで拒絶無く生着させる事が可能であることを見出した(京都大学医学部整形外科共同研究)。

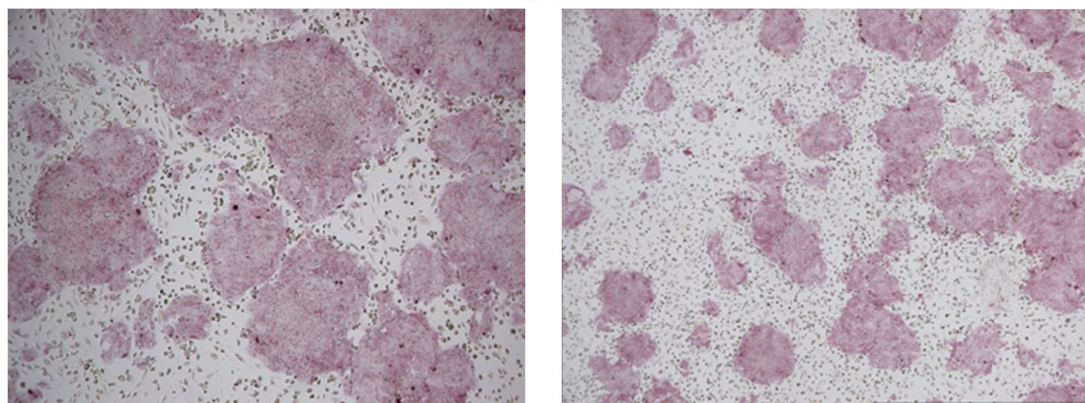
脾臓は凍結解凍によりダメージを受けインスリン分泌能などが低下するため臨床用には凍結保存法は採用されていない。我々は凍結障害を防止し、形態・機能共に維持したまま保存することが可能であることを示した(京都大学医学部移植外科共同研究)。

EGCG で組織を処理することにより移植後の急性期拒絶を抑える可能性を見出した。マウスリンパ球の表面抗原の解析を行い、EGCG が免疫細胞の抗原認識を一部阻害することが原因であることを突きとめ、リンパ球移植実験で効果を確認した。この技術を用いることにより将来的に免疫抑制剤の投与量を減少させることが期待される。

EGCG で移植用血管を処理することで移植後の内膜肥厚を抑制し狭窄を予防できることを発見した。これにより心臓疾患治療のための冠動脈バイパス手術の成功率を高めることが可能である(京都大学医学部心臓血管外科共同研究)(日本科学技術振興機構プレベンチャー事業、文部科学省科学研究費基盤研究 B)

## 不凍ポリアミノ酸を用いた細胞凍結保存液の ヒトES細胞に対する保存効果

(1) PLL(0.65)+EG+Suc      AP 染色      (2) DAP213



細胞: KhES3 (P13)

ヒト ES 細胞のガラス化凍結保存において、不凍ポリアミノ酸(カルボキシル化ポリ-L-リジン)を用いた新規ガラス化保存液が、従来の DAP213 に比べて優れた保存効果が認められた。

## 7. 人体に優しい義歯床

現在、臨床で広く使用されている義歯床として、加熱重合タイプのポリメチルメタクリレート(PMMA)と、射出成型タイプのポリサルホン(PS)やポリカーボネート(PC)が知られている。加熱重合タイプのPMMAは、重合に伴う収縮率が高く、耐衝撃性等の力学的特性に劣る上、特に残留モノマーが多いため、使用時に残留モノマーの溶出によるアレルギー反応が惹起されることが指摘されており、生体に対する安全性の問題が残っている。

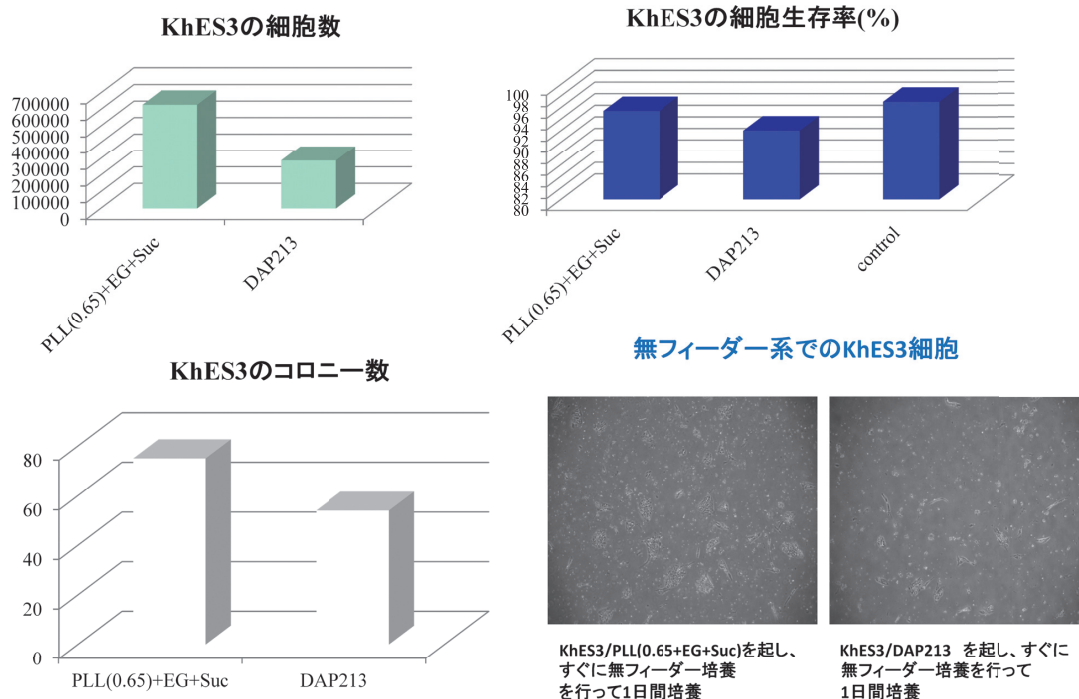
そのため、これに替わる材料としてPSやPCが射出成型用義歯床として使用されるようになって来た。ところがPSは耐衝撃性に劣り、またPCについても、残留モノマーであるビスフェノールが、近年環境ホルモンとしての毒性が大きく取り上げられている。さらにPMMA補修部材としての接着性が悪い為、人体にとって安全で、しかも耐衝撃性等の力学的特性に優れ、残留モノマーが少ない義歯床が切望されてきた。

本研究では、残留モノマーが極めて少なく、刺激や毒性のない人体に優しいのみならず、耐衝撃性や高曲強度で、耐久性に優れた射出成型タイプの義歯床を開発し、臨床の場に提供できた。(近畿経済産業局速攻型地域新生コンソーシアム研究開発事業)

## 8. 生分解性を有する2液反応型の新規医療用接着剤

生体接着剤の中で多くの分野で大量に使用されているのはフィブリン糊である。しかし、血液凝固作用を利用した血液製剤であるため、C型肝炎の感染症問題が非常に大きな社会問題となっている。現状は、各病院ともフィブリン糊の使用に際して、患者よりC型肝炎のリスクがあることを理解している旨の承諾書を取った上で使用されており、フィブリン糊に代わる安全性の高い医療用シーラントの出現が切望されている。また、フィブリン糊の接着力は低く創傷面から剥がれやすいこと、および生体内での分解が早すぎることも問題視されている。

現在までの研究で、分解速度が任意にコントロール可能であること、フィブリン糊より柔軟性が高いこと、毒性



ヒトES細胞のガラス化凍結保存において、不凍ポリアミノ酸を用いた新規ガラス化保存液が従来のDAP213に比べて、解凍後の細胞数、コロニー数、及び細胞生存率が高かった。

が極めて低いこと、フィブリン糊より接着力が高いこと、食品添加物を原料とするため安価で提供できることなどが分かった。更に、心臓血管外科領域での血管の止血、胸部疾患外科領域での肺の空気漏れ閉塞、および消化器外科領域での肝臓の止血など種々の用途での動物実験の良好な結果に基づいて、新規医療用接着剤として実用化でき臨床応用の可能性を見出した。（新エネルギー・産業技術総合開発機構 NEDO：イノベーション推進事業平成 21 年～23 年度）

## 9. DMSO・血清フリーの不凍ポリアミノ酸によるヒト ES/iPS 細胞の凍結保存

培養細胞を利用した研究は生物学や医学分野において欠かせないものであり、各種細胞の維持、保管は主に液体窒素などを用いた低温保存により行われている。培養細胞だけでなく、受精卵や精子などの生殖細胞や血液細胞なども凍結保存されている。また、再生医療に有用な幹細胞も移植前には凍結保存されることが想定される。その際、細胞の機能や生存率をできるだけ維持するため、凍結に由来する様々な障害を防止する目的で凍害防御剤を添加する必要がある。凍害防御剤としてはジメチルスルホキシド(DMSO)やグリセリンなどが挙げられる。DMSO は細胞内に浸透し氷晶の形成を抑制することで凍結時の細胞へのダメージを軽減していると言われ、またグリセリンは細胞を脱水すると共に細胞内において水の結晶化を抑制していると言われる。しかし DMSO は毒性が高く解凍時に速やかに除去する必要がある。また細胞によっては分化に影響を及ぼすなどの問題点があるため、毒性が低く効果の高い凍害防御剤の開発が望まれている。当研究室では、世界で初めて異種たんぱく質の血清フリーで、しかも DMSO と同等以上の凍害防御機能のある高分子化合物を開発した。（文部科学省再生医療実現化プロジェクト：平成 20 年～24 年度、文部科学省科学研究費基盤研究 B：平成 22 年～24 年度、NEDO ヒト ES 細胞産業応用促進基盤技術開発事業：平成 23 年～27 年度）

### 1. Simulation of Biomechanical Adaptation Process of the Living Tissues.

Numerical simulations are carried out especially on the modeling and remodeling phenomena of the bones as the biomechanical adaptation. With constraint functions such as stress distribution or strain energy density distribution, it is indicated that the form of the bone has been modeled, and the design of artificial dental roots which dynamically harmonizes with the living tissue under this constraint has been tried. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

### 2. Regeneration of the periodontal Membrane around Dental Implant Roots.

The present artificial dental root is fixed directly in the alveolar bone without having periodontal ligament like natural tooth root, the stresses are directly transmitted without any damping effect. The excessive stresses in the alveolar bone may arise and cause the bone resorption by which the loosening of the implants occurs. Therefore, we have been attempting that the dental implant made of titanium is covered with a polymer, and the collagen which is the cell adhesive protein is fixed by some surface treatments, and in addition, the periodontal ligament cell is cultivated on the surface for regeneration of the periodontal membrane. (Supported by Ministry of Culture, Science and Education)

### 3. MR Elastography Measurement, Analysis and Verification.

Magnetic resonance elastic modulus measurement method (MRE) of the elastic modulus is a new measuring

technique based on the MRI, and it establishes the technique of the noninvasive elastic modulus measurement of the living tissue and organ in vivo. Database construction for the medical research support, and virtual reality (VR) system using the haptic device are investigated. (Joint Research with Information Division, Kyoto University)

#### **4. New Artificial Articular Cartilage and Intervertebral Disk.**

Development of the artificial cartilage and intervertebral disk is necessary in order to recover support and mobility simultaneously in joints and spine which received the damage. We examined the possibility of the application of polyvinyl alcohol hydrogel which can control the mechanical strength by the change of water content and is excellent in the biocompatibility. It replaces only lesion part and leaves the sound subchondral bone. The high strength and high elastic modulus of the polyvinyl alcohol hydrogel newly developed in this department is promising as artificial articular cartilage and intervertebral disk material. (Supported by Japan Ministry of Health, Labour and Welfare)

#### **5. Polyethylene for Artificial Joints with High Wear Resistance.**

The wear particles of polyethylene are produced by the friction between the metal and UHMWPE when artificial joint used for the long term. It is known that the osteolysis occurs by foreign body granulation tissue which the wear particle induces. The development of new UHMWPE for artificial joint which controlled super structure by the crystallization under molecular orientation is being tried in order to improve abrasion resistance of UHMWPE.

#### **6. Proliferation Control of Mammalian Cells and Tissue Preservation for Long Term.**

EGCG, a green tea polyphenol, not only improves preservation of non-frozen tissues such as cornea, nerves, and pancreatic but solves some potential problems pertaining to transplantation and cardiovascular medicine. EGCG with its immuno-suppressive and anti-proliferative effects prevents graft rejections in various tissues and neo-intimal hyperplasia in vein grafts, respectively. Therefore, the use of EGCG for preserving the living tissues and controlling their cellular responses will provide us a starting point to advance the future of regenerative medicine. (Supported by Japan science and technology)

#### **7. The gentle denture base in human body**

Today, we are researching and developing novel thermoelastic denture base composed of polymethyl-metacrylate (PMMA) as a main component for injection molding. Denture base is generally employed polycarbonate (PC) as thermoelastic resin. However, PC is eluted in one's mouth, bis-phenol A of an environmental pollution, and furthermore, poor adhered to PMMA resin of repair adhesive. Heat-polymerized type PMMA mainly employed as denture base, is eluted in one's mouth a lot of monomer and oligomer, which come from residue product of polymerization, and is anxious to cause an allergy. We are researching and developing novel thermoelastic denture base which overcomes disadvantages of traditional denture resin. (Supported by Kinki area economy department of industry)



## 8. Biodegradable Medical Adhesives

The closing, sealing, and bonding of wounds and defects in various types of tissue still remain problem areas in the field of medicine. To bond a soft tissue interface, numerous studies have been conducted to develop either synthetic or semi synthetic tissue adhesives. Cyanoacrylate, aldehyde-based, and fibrin glue have all been developed for clinical usage. However, some problems have led to limitations in their application, such as toxicity and virus infection.

We recently developed functional medical adhesive of dextran based reactive glue, consisting of aldehyded dextran and  $\epsilon$ -poly (L-lysine), two kinds of medical and food additives, as starting materials. Biocompatibility assay indicated that the functional medical adhesive showed excellent biocompatibility with in vitro and in vivo and most of the functional medical adhesive was histologically degraded within 4 weeks. The excellent performance was observed in comparison to the use of conventional fibrin glue. (Supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization)

## 9. Antifreeze Polyamino Acid with the Cryoprotective Function

Cryoprotective agents (CPAs) such as dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol, and propylene glycol have been used for the cryopreservation of cells and tissues. DMSO is the most effective CPA but shows high cytotoxicity and can effect differentiation.  $\epsilon$ -poly-L-lysine (PLL) derivatives show higher cryopreservation efficiency than the conventional CPAs. Culture medium solutions with 7.5 w/w% of PLL whose amino groups of more than 50 mol% were converted to carboxyl groups by succinic anhydride showed higher post-thaw survival efficiency of L929 cells than those of current CPAs without the addition of any proteins. In addition, rat mesenchymal stem cells were cryopreserved more effectively than with DMSO and fully retained the potential for proliferation and differentiation. Furthermore, many kinds of cells could be cryopreserved with PLL having the appropriate ratio of COOH groups, regardless of the cell types, including adhesive and floating cells, human and mouse derived cells, primary cells and established cell lines. The properties might be associated with the antifreeze protein properties. These results indicate that these polymeric extracellular CPAs may replace current CPAs and the high viability after thawing and non-necessity of serum ensure that these CPAs may be used in various preservation fields. (Supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan)

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Hiroaki Inui, Jinji Mizuno, Suong-Hyu Hyon, Kazuaki Matsumura. : Development of a Low Toxicity and Completely Serum-Free Vitrification System Combining a Cryo-Nano-Hole Vitrification Container with Antifreeze Polyamino-acid (Carboxylated Poly-L-Lysine) for ART. Journal of REPRODUCTION ENGINEERING, in press (2012)

Katsunori Takagi, Tohoshi Tsuchiya, Nasato Araki, Naoya Yamasaki, Takeshi Nagayasu, Suong-Hyu Hyon, Naoki Nakajima. : Novel Biodegradable Powder for Preventing Postoperative Pleural Adhesion. Journal of Surgi-



cal Research(in Press) (2012)

Jun Kanamune, Tatsuo Kina, Yasuhiro Iwanaga, Hirofumi Noguchi, Kazuaki Matsumura, Shinji Uemoto, and Suong-Hyu Hyon, Attenuation of murine GVHD by a tea polyphenol "Cell Transplantation" in press (2012)

Vrana N. E., Matsumura K., Hyon S. -H., Geever L. M., Kennedy J. E., Lyons J. G., Higginbotham C. L., Cahill P. A. and McGuinness G. B. Cell encapsulation and cryostorage in PVA-gelatin cryogel: incorporation of carboxylated  $\epsilon$ -Poly(L-Lysine) as cryoprotectant. J. Tissue Eng. Regen. Med., in press (2012)

Katsunori Takagi, Tomoshi Tsuchiya, Masato Araki, Naoya Yamasaki, Takeshi Nagayasu, Suong-Hyu Hyon, Naoki Nakajima: Novel biodegradable powder for preventing postoperative pleural adhesion. Journal of Surgical Research 04/2012; OI: 10.1016/j.jss.2012.01.056

Hiroki Tsujita, Anthony B Brennan, Caryn E Plummer, Naoki Nakajima, Suong-Hyu Hyon, Kathleen P Barrie, Butch Sapp, Dave Jackson, Dennis E Brooks: An Ex Vivo Model for Suture-Less Amniotic Membrane Transplantation with a Chemically Defined Bioadhesive. Current eye research 03/2012; DOI:10.3109/02713683.2012.663853347

Dong-Wook Han, Mi Hee Lee, Bongju Kim, Jun Jae Lee, Suong-Hyu Hyon and Jong-Chul Park: "Preventive Effects of Epigallocatechin-3-O-Gallate against Replicative Senescence Associated with p53 Acetylation in Human Dermal Fibroblasts," Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2012, Article ID 850684, 13 pages doi: 10.1155/2012/850684 (2012)

## 2) 著 書

(分担)

D. -W. Han, M. H. Lee, S. -H. Hyon, J. -C. Park. Differential cellular responses to Epigallocatechin-3-gallate of human dermal fibroblasts vs. human fibrosarcoma cells, In Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources and Health Benefits (Ed.: Sun) in press, 2012

玄 丞炆, 安全性と機能性に優れた医療用接着剤: 先端バイオマテリアルハンドブック, p.248-253, 秋吉, 石原, 山岡, 監修, (株)エヌ・ティー・エス, 2012.

近田英一, 玄 丞炆, 医療用生分解性材料の開発: 先端バイオマテリアルハンドブック, p.576-580, 秋吉, 石原, 山岡, 監修, (株)エヌ・ティー・エス, 2012.

## ナノバイオメカニズム研究領域 Department of Nano-Biomechanism

助教 都賀谷紀宏

Assist. Prof. Toshihiro Togaya

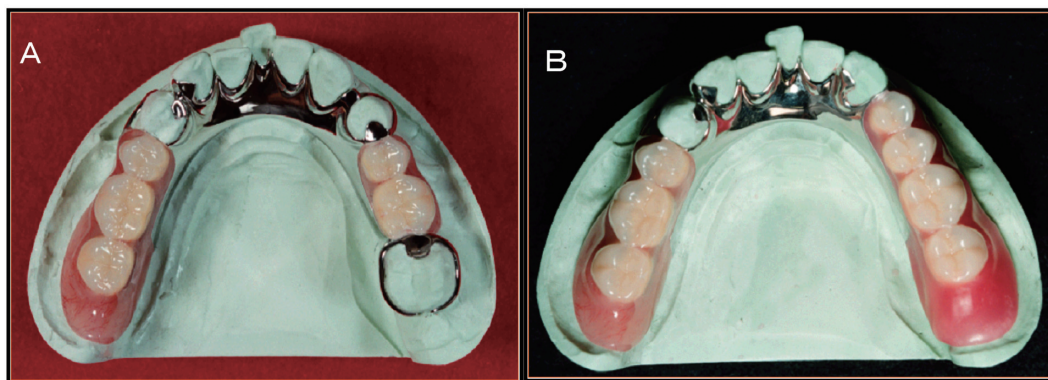
### 【研究概要】

歯の欠損は、歯科口腔機能の障害や低下のみならず、審美性の低下ももたらし、生活の質の低下にも結びつく。近年、高齢化に伴い、従来から用いられている義歯の需要も伸びてきている。また、欠損補綴分野でのインプラントの普及も著しいものがある。このような状況のなか、歯科補綴物の品質に対する要求はより高まってきており、特にインプラントのような人工歯根を用いた場合、その上部構造(義歯)には、高い精度が要求される。

本研究分野では、歯科補綴物に用いられる材料の成形加工法について、レーザー加工法を中心として検討し、生物学的適合性、力学的適合性および形態的適合性に優れた高精度歯科補綴物の製作システムについて研究している。また、これらの歯科補綴物製作を担当する歯科技工士の高齢化や若手技工士の離職率の高さが社会問題になりつつあり、熟練技工士の技術の伝承をいかに行うか、次世代の技工士をいかに養成するか、という社会学的問題についても検討している。

Restoration and maintenance of oral function (ingestion, mastication, swallowing and phonation) are essential for ADL (activity of daily living) and QOL (quality of life) especially in the elderly. The goal of our study is to establish the fabrication systems of precision dental prostheses, which have excellent biological-, mechanical- and morphological-compatibility.

On the other side, there is a big social problem in the manufacturing industry of the dental prostheses in Japan. The society tends to be composed by elderly dental technicians, and many young people in this field quit work because they do not feel financially stable. We are also investigating such a sociological problem.



レーザー加工によってリフォームされた義歯。鉤歯が抜歯されたため、この部分だけ義歯を作製し直し、旧義歯と接合した。これまでは一から作り直さなければならなかったものがリフォームで済み、患者の満足度も高い。

A: リフォーム前    B: リフォーム後

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 著 書

都賀谷紀宏：接合（レーザー溶接・鋲付け）「臨床技工材料学の本」（中込敏夫，伴清治共編，医歯薬出版，東京）107-117(2012)

#### 2) 総 説

朱 可希，都賀谷紀宏：変化する中国歯科技工界の現状と展望を探る－日本の優れた技術をどう活かし，どう付き合うべきか－（前編）現代中国の歯科医療市場と医療保険制度，歯科技工，**40**(7):824-829(2012)

朱 可希，都賀谷紀宏：変化する中国歯科技工界の現状と展望を探る－日本の優れた技術をどう活かし，どう付き合うべきか－（中編）社会的側面からみた現状と今後の成長阻害要因，歯科技工，**40**(9):1050-1059(2012)

朱 可希，都賀谷紀宏：変化する中国歯科技工界の現状と展望を探る－日本の優れた技術をどう活かし，どう付き合うべきか－（後編）グローバル化する中国歯科技工界のこれから，歯科技工，**40**(11):1289-1296(2012)

都賀谷紀宏：グローバル化する歯科技工界－特別レポートを読んで－，歯科技工，**40**(11):1296-1297(2012)

---

### ◆ 学会等の発表 ◆

#### 1) 講演・シンポジウム

都賀谷紀宏：Forum in なら（奈良県歯科技工士会学術講演会）「急変する中国歯科技工業界と日本の歯科技工界の在り方－中国歯科技工界のパワーとアメリカ歯科技工界の変容－」(2012.3.11. 奈良市)

都賀谷紀宏：クローバー会 40 周年記念講演会「急変する中国歯科技工業界－中国歯科技工界のパワーとアメリカ歯科技工界の変容－」(2012.3.25. 大阪市)

都賀谷紀宏：第 3 回京都歯科医療技術専門学校役員・教員研修会（特別講演）「専門学校教育・職業教育のあり方－“働く”とは何か，“仕事”とは何か－」(2012.3.29. 京都市)

都賀谷紀宏：第 25 回歯科レーザー・プロセッシング・フォーラム「中国パワーにより変容するアメリカ歯科技工界」(2012.6.23. 京都市)

都賀谷紀宏：(株)松風・社員研修会「海外から学ぶ歯科技工－グローバル化する歯科技工界－」(2012.7.19. 京都市)

都賀谷紀宏：第 11 回大阪歯科大学学生化学講座同門会講演会「歯科技工界：中国パワーとアメリカの変容－グローバル化する歯科技工界－」(2012.8.25. 大阪市)

都賀谷紀宏：第 26 回歯科レーザー・プロセッシング・フォーラム「歯科技工における技術導入のあり方新しい技術は歯科技工にどのように導入されるべきだろうか？」(2012.10.20. 横浜市)

都賀谷紀宏：第 3 回京都歯科医療技術専門学校役員・教員研修会（特別講演）「海外における歯科事情」(2012.11.21. 京都市)

都賀谷紀宏：平成 24 年日本歯科材料組合・関西支部講演会「グローバル化する歯科技工界－中国パワーと欧米技工界の変容－」(2012.11.27. 大阪市)

都賀谷紀宏：第 523 回愛知学院大学歯科理工懇話会「グローバル化する歯科技工界－中国歯科技工界の隆盛と欧米歯科技工界の変化－」(2012.12.13. 名古屋市)

## バイオメカニクス研究領域 Department of Biomechanics

分野主任 教授 安達 泰治

*Prof. Taiji Adachi*

### 【研究概要】

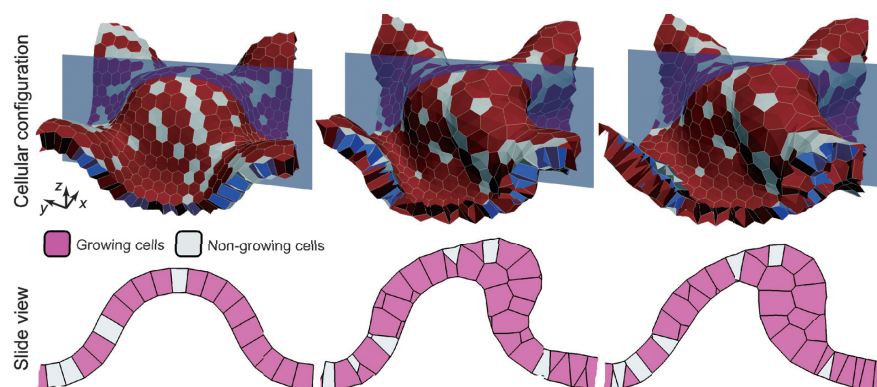
本研究領域は、生体組織の発生・再生における幹細胞分化、形態形成、機能的適応過程において、細胞が分子レベルで力学的刺激を感知し、その情報を細胞の活動に結びつけるメカニズムの解明を目指している。力学的な環境の変化に対する生体の適応的な応答現象は、マクロには生体組織の構造・機能の変化として現れるが、その理解には、細胞・分子レベルにおけるミクロな要素過程とそれらが形成するシステムとしての理解が重要となる。そこで、「力学環境への適応性」と「構造・機能の階層性」に着目し、各種力学を基礎として、実験と数理モデリング・計算機シミュレーションを組み合わせたバイオメカニクス・メカノバイオロジー研究を進めている。

#### (1) 多細胞組織の形態形成のバイオメカニクス

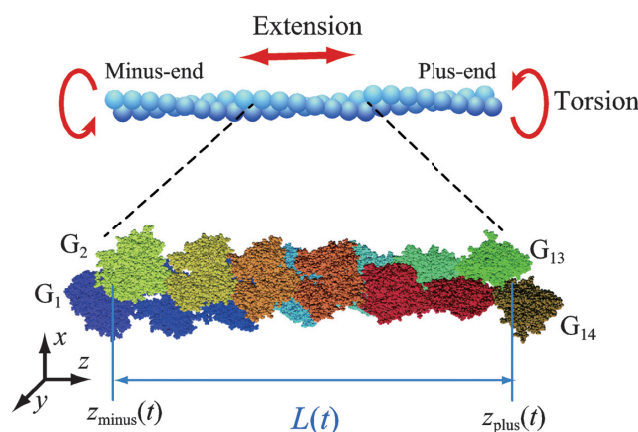
形態形成に伴う組織・器官の大変形の過程を多細胞レベルから解析するため、粒子系モデルを基本とした三次元頂点モデルを発展させ、リバーシブル・ネットワーク・リコネクション(RNR)モデルを新たに構築した。頂点モデルは、組織全体の形状が多面体の頂点と辺からなる一つのネットワークによって表現され、細胞の配置換えがネットワークのパターン切替えによって表現される。本研究で構築したRNRモデルは、ネットワーク内における細胞形状の定義、および、パターン切替え方法の改良により、ネットワークトポロジー・細胞形状・エネルギーについて可逆な配置換えを許容し、さらに、生体組織・器官形成における大変形過程の数値シミュレーションを可能にした。

#### (2) アクチンフィラメントの引張-ねじり連成のバイオメカニクス

アクチンフィラメントはアクチン単量体が二重らせん状に連なった構造をしている。細胞移動、細胞分裂、形態制御などの多くの細胞活動において、アクチンフィラメントの引張やねじれ挙動の力学的変調が、アクチン結合タンパク質の機能調節と関連している。したがって、アクチンフィラメントのダイナミクスを理解するためには、アクチンフィラメントの二重らせん構造に起因した引張-ねじり連成の定量的な評価が重要である。本研究では、引張-ねじり連成を分子動力学シミュレーションによって解析した。まず、アクチンサブユニット14個からなるアクチンフィラメントの分子動力学モデルを構築し、分子動力学シミュレーションによりフィラメント長軸方向とねじれ方向のブラウン運動を解析した。次に、引張-ねじり連成を考慮したハミルトニアンより熱平衡状態におけるエネルギーの理論的な期待値を導出し、分子動力学シミュレーションから得られたブラウン運動の解析結果との比較から引張-ねじり連成を表す剛性値を評価した。ナノ秒スケールにおいて評価された剛性値は、統計平均を取得するためのサンプル時間を長くするにしたがい、ある値に収束した。本研究結果は、張力やねじりが作用する細胞の力学的活動の理解に対して、アクチンフィラメントの引張-ねじり連成の観点から貢献するものである。



(a) Simulation of multi-cellular tissue morphogenesis by the RNR model



(b) Analysis of extension-torsion coupling of actin filament by MD simulation.

図：多細胞組織の形態形成シミュレーションとアクチンフィラメントの引張-ねじり連成解析  
**Fig:** Multiscale biomechanics studies of multi-cellular tissue morphogenesis and actin filament dynamics :  
 Modeling and simulation from molecular level to functional cellular and tissue level.

In functional tissue adaptation, regeneration and stem cell differentiation in morphogenesis, the mechanism by which local mechanical signals are sensed by cells and tissues remodel/regenerate their structure to meet their functional demands remains unclear because of the complex hierarchical system in spatiotemporal scales. To better understand the mechanoregulation of tissue adaptation by remodeling, morphogenesis, and regeneration, bridging spatial and temporal scales from microscopic molecular and cellular activities to macroscopic tissue behaviors is very important. Based on multiscale system biomechanics, our department is involved in integrated biomechanics/mechanobiology researches of modeling and simulation combined with experiments, focusing on mechano-biochemical couplings in the dynamics of structure-function relationships in tissues and cells.

### (1) Biomechanics of multi-cellular tissue morphogenesis

Morphogenesis of tissues in organ development is accompanied by large three-dimensional (3D) deformations, in which mechanical interactions among multiple cells are spatiotemporally regulated. To reveal the deformation mechanisms, we developed the reversible network reconnection (RNR) model. The model was developed on the basis of 3D vertex model, which expresses a multicellular aggregate as a network composed of vertices. The conventional 3D vertex models have successfully simulated morphogenetic dynamics by expressing cellular rearrange-



ments as network reconnections. However, the network reconnections in the 3D vertex models can cause geometrical irreversibility, energetic inconsistency, and topological irreversibility, therefore inducing unphysical results and failures in simulating large deformations. To resolve these problems, we introduced a new definition of the shapes of polygonal faces between cellular polyhedrons and improved conditions for network reconnections and for the shapes of cell-cell boundaries. Mathematical and computational analyses demonstrated that geometrical irreversibility, energetic inconsistency, and topological irreversibility were resolved by suppressing the geometrical gaps in the network and avoiding the generation of irreversible network patterns in reconnections. We successfully demonstrated tissue deformation of growing cell sheets and showed that our model can simulate large tissue deformations, in which large changes occur in the local curvatures and layer formations of tissues.

## (2) Biomechanics of extension-torsion coupling of actin filaments

Actin filaments have a double-helix structure consisting of globular actin molecules. In many mechanical cellular activities, such as cell movement, division, and shape control, modulation of the extensional and torsional dynamics of the filament has been linked to regulatory actin-binding protein functions. Therefore, it is important to quantitatively evaluate extension-torsion coupling of filament to better understand the actin filament dynamics. In the present study, the extension-torsion coupling was investigated using molecular dynamics simulations. We constructed a model for the actin filament consisting of 14 actin subunits in an ionic solvent as a minimal functional unit, and analyzed longitudinal and twisting Brownian motions of the filament. We then derived the expected value of energy associated with extension and torsion at equilibrium, and evaluated the extension-torsion stiffness of the filament from the thermal fluctuations obtained from the MD simulations. The results demonstrated that as the analyzed sampling-window duration was increased, the extension-torsion coupling stiffness evaluated on a nanosecond scale tended to converge to a certain value. The results obtained from this study will contribute to the understanding of biomechanical events, under mechanical tension and torque, involving extension-torsion coupling of filaments.

## 【業績目録】

### ◆ 誌上発表 ◆

#### 1) 原著論文

Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi : Role of the Actin-myosin Catch Bond on Actomyosin Aggregate Formation. Cellular and Molecular Bioengineering, in press

Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi : Modeling Cell Proliferation for Simulating Three-dimensional Tissue Morphogenesis Based on a Reversible Network Reconnection Framework. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, in press

Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Patriche Simona, Takanori Kihara, Jun Miyake, Mihaela Banu, Taiji Adachi : Probing Actin Filament and Binding Protein Interaction Using an Atomic Force Microscopy. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, in press

Sung-Woong Han, Patriche Simona, Mihaela Banu, Taiji Adachi : Real-time Monitoring of Changes in Microtubule

- Mechanical Properties in Response to Microtubule-destabilizing Drug Treatment. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, in press
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiaki Sasai, Taiji Adachi : Reversible Network Reconnection Model for Simulating Large Deformation in Dynamic Tissue Morphogenesis. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, in press
- Hiroshi Kamioka, Yoshitaka Kameo, Yuichi Imai, Astrid D Bakker, Rommel G Bacabac, Naoko Yamada, Akio Takaoka, Takashi Yamashiro, Taiji Adachi, Jenneke Klein-Nulend : Microscale Fluid Flow Analysis in a Human Osteocyte Canaliculus Using a Realistic High-resolution Image-based Three-dimensional Model. Integrative Biology, 4-10 : 1198-1206(2012-9)
- Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi : Spatiotemporal Coordinated Hierarchical Properties of Cellular Protrusion Revealed by Multiscale Analysis. Integrative Biology, 4-8 : 875-888(2012-7)
- Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi : Quantitative Analysis of Extension-torsion Coupling of Actin Filaments. Biochemical and Biophysical Research Communications, 420-4 : 710-713(2012-4)
- Satoru Hayano, Hiroshi Kurosaka, Takeshi Yanagita, Ina Kalus, Fabian Milz, Yoshihito Ishihara, Md. Nurul Islam, Noriaki Kawanabe, Masahiro Saito, Hiroshi Kamioka, Taiji Adachi, Thomas Dierks, Takashi Yamashiro : Roles of Heparan Sulfate Sulfation in Dentinogenesis. Journal of Biological Chemistry, 287-15 : 12217-12229 (2012-4)
- Hidetaka Yamaoka, Shinji Matsushita, Yoshitaka Shimada, Taiji Adachi : Multiscale Modeling and Mechanics of Filamentous Actin Cytoskeleton. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 11-3/4 : 291-302(2012-3)
- Masaki Hojo, Yukinobu Matsushita, Mototsugu Tanaka, Taiji Adachi : Interfacial Fatigue Crack Propagation in Microscopic Model Composite Using Bifiber Shear Specimens. Composites Part A : Applied Science and Manufacturing, 43-2 : 239-246(2012-2)
- Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Go Uchida, Yutaka Yamagata : Characteristics of Motility-based Filtering of Adherent Cells on Microgrooved Surfaces. Biomaterials, 33-2 : 395-401(2012-1)

## 2) 著 書

- 亀尾佳貴, 安達泰治(分担執筆) : 力学環境に対する骨組織の機能的適応現象の数値モデル, In : 再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み(新材料・新素材シリーズ), 第4章3節 : 200-209, シーエムシー出版(2012-5)
- 安達泰治(分担執筆) : 骨リモデリング, In : シミュレーション辞典, 日本シミュレーション学会編 : 316, コロナ社(2012-2)

---

## ◆ 学会等の発表 ◆

### 1) 学会・研究会発表

- 田原大輔, 名倉 健, 堀川 武, 安達泰治 : 骨リモデリングシミュレーションに基づく骨粗鬆骨の骨梁形態変化と荷重支持機能の異方性の評価. 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング部門講演会(2012.1.7-8. 豊中)
- 三好洋美, 朱 正明, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, 安達泰治, 山形 豊 : 細胞-基質相互作用を利

- 用した細胞運動の非侵襲制御. 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング部門講演会(2012.1.7-8. 豊中)
- 松下慎二, 井上康博, 安達泰治: アクチンサブユニット間の非線形力学特性の評価. 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会(2012.1.7-8. 豊中)
- 奥田 覚, 井上康博, 永樂元次, 笹井芳樹, 安達泰治: 組織発生の形態形成過程における細胞の分裂と成長のモデル化. 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング部門講演会(2012.1.7-8. 豊中)
- 石橋弘輝, 井上康博, 安達泰治: 吸収腔の移動に着目した骨リモデリングシミュレーション. 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング部門講演会(2012.1.7-8. 豊中)
- 村田勝章, 須長純子, 佐藤正明, 安達泰治: 骨細胞突起のメカノセンシング特性. 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング部門講演会(2012.1.7-8. 豊中)
- 中川光司, 井上康博, 奥田 覚, 安達泰治: 細胞質分裂における収縮環の力発生と細胞膜変形との関連: 力学シミュレーションによる検討. 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング部門講演会(2012.1.7-8. 豊中)
- Hiromi Miyoshi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Taiji Adachi, Yutaka Yamagata: Role of Actin Cytoskeletal Structure and Cell-Substrate Adhesion for Cell Migration on Micro-Structured Surfaces. Biophysical Society 56<sup>th</sup> Annual Meeting(2012.2.25-29. San Diego, U.S.A.)
- Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Molecular Dynamics Analysis of Coupling Behaviors between Extension and Torsion of Actin Filaments Micro-Structured Surfaces. Biophysical Society 56<sup>th</sup> Annual Meeting(2012.2.25-29. San Diego, U.S.A.).
- Yasuhiro Inoue, Shunsuke Tsuda, Koji Nakagawa, Masaki Hojo, Taiji Adachi: Modeling and Simulation of Myosin-dependent Rearrangement and Force Generation in an Actomyosin Network. Biophysical Society 56<sup>th</sup> Annual Meeting(2012.2.25-29. San Diego, U.S.A. )
- Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Evaluation of Amyloid Precursor Protein and  $\beta$ -Secretase Interactions Using an AFM. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)
- Masaaki Murata, Junko Sunaga, Masaaki Sato, Taiji Adachi: Characteristics of Nitric Oxide Production in Mechanically Stimulated Osteocytes. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)
- Kensuke Suzuki, Junko Sunaga, Taiji Adachi: Biomechanical Study on Neuronal Migration using Micropattern. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)
- Kyohei Morita, Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Development of Actin Dynamics Measurement Method using an AFM. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)
- Yoshiaki Kondo, Shinji Matsushita, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Molecular Dynamics Simulation Study of Mechanical Behavior of Actin Subunits in the Actin Filament. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)
- Hiroshi Kamioka, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi: Microscale Fluid Flow Analysis in a Human Osteocyte Canaliculus Using a Realistic High-Resolution Image-Based Three-Dimensional Model. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)
- Kentaro Takenaka, Hiroki Ishibashi, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Trabecular Remodeling Simulation Considering Bone Remodeling Cycle. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)
- Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Evaluation for Mechanical Properties of Nanospring Protein using AFM. International Symposium on Cellular Mechanobiology(2012.3.16. Kyoto)

- Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Cofilactin Filament Model for Molecular Dynamics Simulation. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi: Three-Dimensional Vertex Model for Simulating Large Deformation of Cell Aggregates during Tissue Morphogenesis. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Koji Nakagawa, Yasuhiro Inoue, Satoru Okuda, Taiji Adachi: Mathematical Modeling and Simulation of Mechanical Behavior of Cell during Cytokinesis. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi: Three-dimensional Vertex Model for Morphogenesis of Multiple-cell Tissue with Physical and Topological Consistency. CDB Symposium 2012: Quantitative Developmental Biology, RIKEN Center for Developmental Biology (2012.3.26-28. Kobe)
- Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Go Uchida, Yutaka Yamagata: Directional Decisions of Migrating Cells on Micro-topographical Surfaces. CDB Symposium 2012: Quantitative Developmental Biology, RIKEN Center for Developmental Biology (2012.3.26-28. Kobe)
- 鈴木健介, 須長純子, 安達泰治: ガラス基質上のN-カドヘリン濃度が単離神経細胞の運動に与える影響. 第51回日本生体医工学学会大会 (2012.5.10-12. 福岡)
- Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Dong Jin Cho, Jong Soo Ko, Yutaka Yamagata: Contributions of Actin Cytoskeleton and Cell-substrate Adhesion in Control of Cell Motile Behavior in Microtopographical Environments. Joint Meeting of JSDB 45<sup>th</sup> & JSCB 64<sup>th</sup> (2012.5.28-31. Kobe)
- 田原大輔, 名倉 健, 辻上哲也, 安達泰治: 骨リモデリング・マルチスケールシミュレーションからの骨質評価へのアプローチ. 第17回計算工学講演会 (2012.5.29-31. 京都)
- 木田直樹, 山村直人, J. L. Alves, C. Teodosiu, 中村達雄, 安達泰治: 平滑筋の自己収縮力及び残留応力を考慮した血管壁の三次元有限要素解. 第17回計算工学講演会 (2012.5.29-31. 京都)
- 井上康博, 安達泰治: アクチンバイオメカニクスシミュレーションでわかった細胞の力学-生化学連成のしくみ. 第17回計算工学講演会 (2012.5.29-31. 京都)
- 鈴木健介, 須長純子, 安達泰治: N-カドヘリンコートされたガラス基質上における単離神経細胞の運動解析. 第35回日本バイオレオロジー学会 (2012.5.31-6.2. 新潟)
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi: Poroelastic Analysis of Interstitial Fluid Flow in Trabecula under Cyclic Loading. 18<sup>th</sup> Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2012) (2012.7.1-4 Lisbon, Portugal)
- Taiji Adachi, Kennedy O. Okeyo: Upregulation of Actomyosin Contractility Enhances Mechanical Integrity of Actin Cytoskeleton in Lamellipodia. 18<sup>th</sup> Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2012) (2012.7.1-4. Lisbon, Portugal)
- Daisuke Tawara, Ken Nagura, Taiji Adachi: Remodeling Simulation Estimates Changes in Mechanical Properties of Osteoporotic Bone. 18<sup>th</sup> Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2012) (2012.7.1-4. Lisbon, Portugal)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi: Mathematical Model for Large Deformations of Multiple-cell Aggregate during Tissue Morphogenesis. 10<sup>th</sup> World Congress on Computational Mechanics (WCCM2012) (2012.7.8-13. Sao Paulo, Brazil)

- Taiji Adachi, Masakazu Hasegawa, Teruko Takano-Yamamoto: Application of a Level-set Method for Simulation of Orthodontic Tooth Movement Using CT Image-based Voxel FE Models. 10<sup>th</sup> World Congress on Computational Mechanics (WCCM2012) (2012.7.8-13. Sao Paulo, Brazil)
- Yasuhiro Inoue and Taiji Adachi: Rearrangement Dynamics of Contractile Actomyosin Network. 10<sup>th</sup> World Congress on Computational Mechanics (WCCM2012) (2012.7.8-13. Sao Paulo, Brazil)
- 近藤由章, 松下慎二, 井上康博, 安達泰治: 分子動力学法を用いたアクチンフィラメント内サブユニットの力学的挙動の検討. 日本機械学会 2012 年度年次大会 (2012.9.10-12. 金沢)
- 鈴木健介, 須長純子, 安達泰治: 神経細胞の運動解析のための in vitro 実験系構築. 日本機械学会 2012 年度年次大会 (2012.9.10-12. 金沢)
- 森田恭平, 韓 成雄, 安達泰治: AFM を用いたアクチンフィラメントの分子ナノ力学測定法. 日本機械学会 2012 年度年次大会 (2012.9.10-12. 金沢)
- 亀尾佳貴, 山本隆太, 大多尾義弘, 石原正行, 上岡 寛, 安達泰治: 骨細管内の間質液流れによる骨細胞突起変形シミュレーション. 日本機械学会 2012 年度年次大会 (2012.9.10-12. 金沢)
- 奥田 覚, 井上康博, 永樂元次, 笹井芳樹, 安達泰治: 形態形成過程における多細胞組織の大変形シミュレーションのためのリバーシブル・ネットワーク・リコネクションモデル. 日本数理生物学会第 22 回大会 (2012.9.10-12. 岡山).
- Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Molecular Dynamics Model of Cofilactin Filament. 日本生物物理学会第 50 回年会 (2012.9.22-24. 名古屋)
- Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Analysis of the Mechanical Behavior of b-catenin Using AFM. 日本生物物理学会第 50 回年会 (2012.9.22-24. 名古屋)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, Taiji Adachi: Simulations of Large Deformation during Tissue Morphogenesis Using Reversible Network Reconnection Model. 日本生物物理学会第 50 回年会 (2012.9.22-24. 名古屋)
- 竹中健太郎, 井上康博, 安達泰治: 骨梁リモデリングにおけるシグナル伝達機構の数理モデル化. 日本機械学会第 23 回バイオフロンティア講演会 (2012.10.5-6. 弘前)
- 藤井徹矢, 井上康博, 安達泰治: 分子動力学法によるコフィリン修飾アクチンフィラメントの平衡化シミュレーション. 日本機械学会第 23 回バイオフロンティア講演会 (2012.10.5-6. 弘前)
- 牧 功一郎, 韓 成雄, 安達泰治:  $\beta$ -カテニンの AFM 単分子力学測定. 日本機械学会第 23 回バイオフロンティア講演会 (2012.10.5-6 弘前)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Yoshiki Sasai, and Taiji Adachi: Large Deformation of Multicellular Tissue during Morphogenesis Using Reversible Network Reconnection Model. Exciting Biologies: Forces in Biology (2012.10.4-6. Dublin, Ireland)
- Hiromi Miyoshi, Jungmyoung Ju, Sang Min Lee, Jong Soo Ko, Taiji Adachi, Yutaka Yamagata: Image-based Analysis of Spatial Organization of the Cellular Actin Cytoskeleton in Micro-topographical Environments. Exciting Biologies: Forces in Biology (2012.10.4-6. Dublin, Ireland)
- Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Energy Analysis of a Cofilin-decorated actin Filament Using Molecular Dynamics Simulations. Conference on Computational Physics (CCP2012) (2012.10.14-18. Kobe)
- 森田恭平, 韓 成雄, 安達泰治: AFM を用いたアクチンフィラメントの分子ナノ力学測定法. 日本機械学会第 4



回マイクロ・ナノ工学シンポジウム(2012.10.22-24. 北九州)

井上康博, 安達泰治: 形態形成ダイナミクスのマルチスケール計算メカノバイオロジー. 日本機械学会第4回マイクロ・ナノ工学シンポジウム(2012.10.22-24. 北九州)

近藤由章, 井上康博, 安達泰治: 張力作用によるアクチンフィラメント内アクチン修飾タンパク質 結合残基群の立体構造変化の分子動力学シミュレーション. 日本機械学会第4回マイクロ・ナノ工学シンポジウム(2012.10.22-24. 北九州)

Sung-Woong Han, Ko-ichiro Maki, Taiji Adachi: Evaluation for Mechanical Behavior of Nanospring Protein in Adherence Junction Using AFM. The 12<sup>th</sup> International Discussion & Conference on Nano Interface Controlled Electronic Devices (IDC-NICE 2012) (2012.10.24-27. Gyeongju, Korea)

田原大輔, 名倉 健, 辻上哲也, 安達泰治: 骨粗鬆症の骨梁形態変化の予測と荷重支持機能の変化のシミュレーション. 第39回日本臨床バイオメカニクス学会(2012.11.9-10. 千葉)

Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi: Modeling Trabecular Bone Adaptation Regulated by Mechanosensing Osteocytes. 3rd Asian Conference on Mechanics of Functional Materials and Structures (ACMFMS2012) (2012.12.5-8. New Delhi, India)

## 2) 講演・シンポジウム

安達泰治: 細胞力学シミュレーション: アクチン細胞骨格の適応的ふるまい. 第25期 CAMM フォーラム(2012.3.2. 東京) (Seminar)

安達泰治: 生体システムの構造・機能適応ダイナミクスの力学的理解. 次世代生命体統合シミュレーション研究シンポジウム(2012.3.6. 神戸) (Symposium)

Taiji Adachi: Characteristics of Nitric Oxide Production in Mechanically Stimulated Osteocytes. International Symposium on Cellular Mechanobiology (2012.3.16. Kyoto) (Symposium)

Taiji Adachi, Shinji Matsushita, Yoshihiro Inoue: Mechanical Behavior of Actin Filaments under Tension: A Molecular Dynamics Simulation Study. 10<sup>th</sup> International Symposium on Biomechanics and Biomedical Engineering (2012.4.11-14. Berlin, Germany) (Plenary Talk)

Taiji Adachi: Mechanical Regulation of Actin Network Dynamics in Migrating Cells (From Cells to Molecules). Young Scientists' Colloquium, iCeMS Kyoto University (2012.4.27. Kyoto) (Seminar)

Taiji Adachi: Multiscale Biomechanics of Bone Functional Adaptation by Remodeling. Lecture at the Egypt-Japan University of Science and Technology. (2012.5.14. Alexandria, Egypt) (Lecture)

Taiji Adachi: Computer Simulation of Bone Remodeling and Regeneration for Porous Scaffold Design. Symposium on Frontier in Tissue Engineering, Scaffold, Drug Delivery Systems (2012.5.16. Alexandria, Egypt) (Invited Lecture)

Taiji Adachi: Mechanical Regulation of Actin Network Dynamics in Migrating Cells (From Cells to Molecules). E-JUST Seminar (2012.5.17. Alexandria, Egypt) (Seminar)

安達泰治: 骨の構造・機能適応ダイナミクスの階層性: システムバイオメカニクス. ニューセラミックス懇話会(バイオ関連セラミックス分科会第37回研究会) (2012.5.25. 大阪) (Seminar)

安達泰治: 生体システムの構造・機能適応ダイナミクスのバイオメカニクス. 第1回多細胞動態研究のためのプレインストーミングワークショップ「多細胞動態の力学的制御とそのモデル化(生化学場との統合的理解を目

指して)」(2012.6.26-27. 神戸)(Workshop)

Taiji Adachi, Masaaki Murata, Junko Sunaga, Masaaki Sato : Nitric Oxide Production Induced by Local Mechanical Stimulus in Isolated Osteocytes. Symposium on Cell Mechanics and Cytoskeleton. 14<sup>th</sup> International Congress of Biorheology and 7<sup>th</sup> International Conference on Clinical Hemoreheology, Biorheology (2012.7.4-7. Istanbul, Turkey) (Symposium)

安達泰治：骨の構造・機能適応ダイナミクスの階層性：数理バイオメカニクス．第13回運動器科学研究会(2012.9.14-15. 京都)(特別講演)

安達泰治：骨構造の階層性と機能的適応：数理生体力学．西安交通大学特別講義(2012.12.10. 西安, 中国)(特別講義)

Yasuhiro Inoue, Shinji Matsushita, Taiji Adachi : Molecular Dynamics Simulation of an Actin Filament. KSME-JSME Joint Symposium on Computational Mechanics & CAE 2012, Mechanical Engineering Congress, JSME(2012.9.12. Kanazawa) (Symposium)

安達泰治：細胞バイオメカニクス研究の動向：力学－生化学連成による機能制御．同志社大学生体医療材料研究センターシンポジウム：細胞バイオメカニクスの新展開(2012.12.22. 京田辺)(Symposium)

井上康博：多細胞力学系のマルチスケールシミュレーション．日本応用数理学会数理医学研究部会第30回数理医学セミナー(2012.12.25. 豊中)(Seminar)

## 技 術 部

### Division of Technical Support

#### 【研究支援概要】

2012 年は 1 月より 12 月末までに 8 分野 164 件の利用があり、再生実験試料等の特殊な組織標本作製なども含め、個々の研究者の要望に添えてきた。また、固定、包埋から染色、封入までの病理組織標本作製や免疫染色などの技術指導、クリオスタットの共同利用者への凍結切片作製の指導も行ってきた。

- ・パラフィン切片作製、凍結切片作製、ブロックの作製、脱灰標本の作製
- ・一般染色 (Hematoxylin-Eosin stain)
- ・特殊染色 (Azan stain, Alcian blue stain, Berlin blue stain, Dahl's method, Elastica-Van Gieson stain, Giemsa stain, Kluver-Barrera stain, Masson's trichrome stain, Maxwell's stain, Nissl's stain, PTAH, Toluidine blue stain, Safranin O-Fast green stain, Villanueva bone stain, von Kossa's method, Silver stain)
- ・免疫染色 ( $\alpha$ SMA, Desmin, vWF VIII, Vimentin, CD4, CD45R, MHC, CD68, CD31, Collagen type-I, Type-II, MSP2, HBME-1, GFP, Cytokeratin, Synaptopodin, Neurofilament, PECAM1, AQP1)

## 4. 学術集会

### 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 平成 24 年度 学術講演会

開催日：2012 年 12 月 19 日(水)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

#### セッション 1

座長：松岡 雅雄(京都大学ウイルス研究所 所長)

「血液細胞の新しい分化モデル～古典的なミエロイド系／リンパ系二分法の概念からの脱却～」

河本 宏(京都大学再生医科学研究所 教授)

「幹細胞における短周期遺伝子発現振動の動作原理と意義」

影山龍一郎(京都大学ウイルス研究所 教授)

ポスターセッション

#### セッション 2

座長：吉崎 武尚(京都大学大学院工学研究科 教授)

「両反応性高分子の創製と再生医療への展開」

岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所 教授)

「細胞の力学的適応のバイオメカニクス」

佐藤 正明(東北大学大学院医工学研究科 教授)

「自律神経系の発生・病理から明らかになる細胞のダイナミックな振る舞い」

榎本 秀樹 (理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター  
神経分化・再生研究室 特別主管研究員)

閉会の挨拶 副所長 開 祐司(京都大学再生医科学研究所)

【ポスターセッション】

ポスター 1

タンパク質の凝集とその疾患に関して新しい概念を構築する

山崎 正幸(細胞機能調節学分野)

ポスター 2

糖タンパク質の品質管理－小胞体における糖鎖の「枝」の役割－

細川 暢子(細胞機能調節学分野)

ポスター 3

転写開始複合体形成におけるクロマチンリモデリング因子の関与

法邑 賢一、平芳 一法(細胞機能調節学分野)

ポスター 4

Spontaneous development of autoimmune arthritis and colitis in ZAC mice

田中 淳(生体機能調節学分野)

ポスター 5

Transplantation of Co-aggregates Formed from Cells of Dissociated Islets and Sertoli cells to Treat Type 1 Diabetes in Mouse Model  
○Naohiro TAKEMOTO, Xibao LIU, Kento TAKII, and Hiroo IWATA(組織修復材料学分野)

ポスター 6

胚性幹細胞からインスリン産生細胞を誘導する方法の検討  
－無血清培地下での Activin A と Retinoic acid の投与法の工夫－

白水 泰昌(器官形成応用分野)

ポスター 7

Artificial Trachea and in situ Tissue Engineering

中村 達雄(臓器再建応用分野)

ポスター 8

MANUFACTURING AND BANKING OF CLINICAL-GRADE HUMAN EMBRYONIC STEM CELL LINES IN A GMP FACILITY  
高田 圭(胚性幹細胞研究分野)

ポスター 9

Recombinant E8 fragments of human laminin isoforms support the efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells under defined and xeno-free condition

宮崎 隆道(胚性幹細胞研究分野)

ポスター 10

Self-Renewal and Pluripotency Acquired through Somatic Reprogramming to Human Cancer Stem Cells

平野 邦生(幹細胞加工研究分野)

ポスター 11

自然免疫因子リポカリン 2 は細胞膜リン脂質フォスファチジルエタノールアミンに結合し、雌生殖路内で精子成熟を促進する

渡邊 仁美(附属再生実験動物施設)

ポスター 12

原子間力顕微鏡を用いた生体分子の力学的計測

韓 成雄(バイオメカニクス研究領域)



## 京都大学再生医科学研究所「若手発表会」

開催日：2012 年 12 月 19 日(水)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 所長 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

セッション 1 座長：平向 洋介(再生増殖制御学分野)

1 分子イメージングによる接着斑の構造と動態の解析 柴田 明裕(ナノバイオプロセス研究領域)

Computational biomechanics in complicated deformation during dynamic tissue morphogenesis  
奥田 覚(バイオメカニクス研究領域)

Promotion of bone repairing by use of novel collagen scaffolds in rabbit skull defect model  
若槻 麻里子(臓器再建応用分野)

The role of N16 in maintenance of DNA stability and recombination in mice 望月 綾子(発生分化研究分野)

セッション 2 座長：望月 綾子(発生分化研究分野)

ウサギ外傷性膝変形性膝関節症モデルに対する EP2 アゴニスト膝関節注射剤の有用性 福田 誠(組織再生応用分野)

ADAM19 is required for proper differentiation of the Cardiac Neural Crest 荒井 宏行(再生増殖制御学分野)

血管内皮細胞分化での RSK の役割 松永 太一(幹細胞分化制御研究分野)

自然免疫因子リポカリン 2 は細胞膜リン脂質フォスファチジルエタノールアミンに結合し、雌生殖路内で精子成熟を促進する  
渡邊 仁美(附属再生実験動物施設)

セッション 3 座長：福田 誠(組織再生応用分野)

The function and Expression Regulation of Nanog in Mouse Epiblast Sun Liang Tso(幹細胞加工研究分野)

多血小板血漿徐放化ゼラチンハイドロゲルを用いた骨再生誘導 松井 誠(生体材料学分野)

Studies on polyvinyl alcohol-macro-encapsulated islets for diabetes therapy 柳井 伍一(器官形成応用分野)

生体軟部組織に対する非線形有限要素解析 木田 直樹(臓器再建応用分野)

### 【ポスターセッション】

ポスター 1  
ヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経のアガロスマイクロカプセル化 小長谷 周平(組織修復材料学分野)

ポスター 2  
生体吸収性ハイドロゲル足場を活用した 3 次元細胞集合体の構築 田島 脩平(生体材料学分野)

ポスター 3  
Promotion of bone repairing by use of novel collagen scaffolds in rabbit skull defect model  
若槻 麻里子(臓器再建応用分野)

ポスター 4  
The role of IKK $\beta$  in endochondral ossification 小林 恭介(組織再生応用分野)

ポスター 5  
Studies on polyvinyl alcohol-macro-encapsulated islets for diabetes therapy 柳井 伍一(器官形成応用分野)

ポスター 6  
多血小板血漿徐放化ゼラチンハイドロゲルを用いた骨再生誘導 松井 誠(生体材料学分野)

ポスター 7  
血管内皮細胞分化での RSK の役割 松永 太一(幹細胞分化制御研究分野)

ポスター 8  
1 分子イメージングによる接着斑の構造と動態の解析 柴田 明裕(ナノバイオプロセス研究領域)

ポスター 9  
Computational biomechanics in complicated deformation during dynamic tissue morphogenesis  
奥田 覚(バイオメカニクス研究領域)

## 京都大学再生医科学研究所平成 23 年度共同研究会

開催日：2012 年 3 月 12 日(月)  
場 所：京都大学再生医科学研究所

### 開会挨拶

岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所 所長)

「キメラマウス胚を用いた概日時計発生過程のリアルタイムイメージング」

八木田 和弘 教授(京都府立医科大学大学院医学研究科)

「機能的神経ネットワーク構築のための生物学および工学」

鳥光 慶一 主席研究員(NTT 物性科学基礎研究所)

「細胞移植治療を目指したペプチドによる細胞凝集塊の誘導」

平野 義明 教授(関西大学化学生命工学部)

「自己活性化型 Cys-Pro エステルユニットを利用した細胞表面タンパク質の標識法の開発と軟骨前駆細胞の同定への応用」

川上 徹 准教授(大阪大学蛋白質研究所)

「矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析」

山本 照子 教授(東北大学大学院歯学研究科)

「腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用」

浅原 弘嗣 教授(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

「トランスジェニックゼブラフィッシュを用いた側線における細胞間相互作用の研究」川上 浩一 教授(国立遺伝学研究所)

### 閉会挨拶

開 祐司(京都大学再生医科学研究所 副所長)

## 京都大学再生医科学研究所 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」 第 7 回公開講演会 分子から細胞さらに再生医療へ

開催日：2012 年 7 月 14 日(土)  
場 所：京都大学百周年時計台記念館 1 階百周年記念ホール

### 開会挨拶

「ES 細胞医療の実現に向けて」

再生医科学研究所 末盛 博文 准教授

「1 分子毎に見て細胞膜がはたらく仕組みを解く」

再生医科学研究所 楠見 明弘 教授

## 分野主催のセミナー

| 開催日        | 講演者・所属                                                                     | 演 題                                                                                                           | セミナー名              | 主催分野         |
|------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------|
| 2012. 1.20 | 田中 幹子<br>(東京工業大学大学院生命理工学研究科)                                               | 脊椎動物の対鰭と四肢の発生と進化                                                                                              | 京都大学再生医科学研究所特別セミナー | 生体分子設計学分野    |
| 2012. 2. 3 | 小守 壽文<br>(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)                                                | 骨細胞ネットワークを介した解糖系酵素 Pyruvate dehydrogenase 4(Pdk4) による非荷重の骨量制御                                                 | 京都大学再生医科学研究所特別セミナー | 生体分子設計学分野    |
| 2012. 2.23 | 横田 義史<br>(福井大学医学部医学科生命情報医科学講座)                                             | マウス消化管の運命決定と転写調節因子 Id2                                                                                        | 細胞機能調節学セミナー        | 細胞機能調節学分野    |
| 2012. 2.24 | 池川 志郎<br>(独)理化学研究所ゲノム医科学研究センター)                                            | ゲノムワイド相関解析の課題と今後の展開－特発性側弯症を例に                                                                                 | 京都大学再生医科学研究所特別セミナー | 生体分子設計学分野    |
| 2012. 3.23 | 鄭 雄一<br>(東京大学大学院工学系研究科)                                                    | 高機能人工骨の開発                                                                                                     | 京都大学再生医科学研究所特別セミナー | 生体分子設計学分野    |
| 2012. 4.16 | 松田 武久<br>(金沢工科大学ゲノム生物工学研究所)                                                | In situ capture of endothelial progenitor cells: Surface architecture cellular responses and tissue formation | 組織修復セミナー           | 組織修復材料学分野    |
| 2012. 6. 8 | 伊井 仁志<br>(大阪大学大学院基礎工学研究科機能創成専攻)                                            | スペクトリン網目構造を考慮した生体膜の力学モデル開発                                                                                    | 第9回バイオメカニクスセミナー    | バイオメカニクス研究領域 |
| 2012. 7.18 | 佐藤 正明<br>(東北大学大学院医工学研究科)                                                   | 細胞の力学応答のバイオメカニクス－細胞内における力とシグナルの伝達－                                                                            | 第10回バイオメカニクスセミナー   | バイオメカニクス研究領域 |
| 2012.10.12 | 武田 洋幸<br>(東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)                                             | メダカゲノムが語る脊椎動物の発生と進化                                                                                           | 再生増殖制御学分野セミナー      | 再生増殖制御学分野    |
| 2012.10.24 | 青木 友浩<br>(京都大学医学部神経細胞薬理学教室)                                                | 脳血管壁の慢性炎症疾患としての脳動脈瘤形成仮説と薬物治療開発への展望                                                                            | 組織修復セミナー           | 組織修復材料学分野    |
| 2012.11. 2 | 樋口 京一<br>(信州大学大学院医学系研究科加齢生物学講座)                                            | アミロイドーシスは伝播するか？－タンパク質フォールディング病の共通メカニズムとしての伝播現象－                                                               | 細胞機能調節学セミナー        | 細胞機能調節学分野    |
| 2012.11.22 | 笹井 紀明<br>(National Institute for Medical Research, London)                 | Sonic Hedgehog and its transcriptional network control neural tube pattern formation                          | 再生増殖制御学分野セミナー      | 再生増殖制御学分野    |
| 2012.11.30 | Gou-Jen Wang<br>(National Chung-Hsing University)                          | Fabrication of Biodegradable Microvessel Scaffolds                                                            | 組織修復セミナー           | 組織修復材料学分野    |
| 2012.12. 7 | 森下 喜弘<br>(理化学研究所発生・再生科学総合研究センター発生幾何研究ユニット)                                 | 脊椎動物四肢発生過程における組織変形ダイナミクスの定量解析とロバストなパターンニングを実現するための空間情報のコーディングデザイン                                             | 第11回バイオメカニクスセミナー   | バイオメカニクス研究領域 |
| 2012.12.14 | 大橋 俊朗<br>(北海道大学大学院工学研究院人間機械システムデザイン部門)                                     | マイクロスケール空間細胞培養実験のためのバイオ MEMS デバイスの開発                                                                          | 第12回バイオメカニクスセミナー   | バイオメカニクス研究領域 |
| 2012.12.26 | 岩波 礼将<br>(Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg) | 獲得免疫システム発生の分子機構解明に向けたモデル動物としてのゼブラフィッシュ                                                                        | 再生増殖制御学分野セミナー      | 再生増殖制御学分野    |

## 学術講演会・シンポジウム・研究会

(組織修復材料学分野)

### 新学術領域研究“ナノメディシン分子科学”第2回全体会議・公開シンポジウム

開催日：2012年3月7日(水)

開催場所：京都市国際交流会館メインホール

### The 3rd Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine

開催日：2012年3月8日(木)～3月9日(金)

開催場所：Main hall, Kyoto International Community House

### 第15回日本異種移植研究会

開催日：2012年12月8日(土)

開催場所：京都大学南部総合研究1号館・再生研西館 共同セミナー室

(バイオメカニクス研究領域)

### International Symposium on Cellular Mechanobiology

開催日：2012年3月16日(金)

開催場所：Kyoto University Clock Tower Centennial Hall

(再生免疫学分野)

### Kyoto T Cell Conference 第22回学術集会

開催日：2012年7月6日(金)～7日(土)

開催場所：和順会館(京都)

(生体分子設計学分野)

### 第13回運動器科学研究会

開催日：2012年9月14日(金)～15日(土)

開催場所：アピカルイン京都

(再生増殖制御学分野)

### 第18回小型魚類研究会

開催日：2012年9月22日(土)～23日(日)

開催場所：芝蘭会館

## 5. 共同研究

### 2011 年度共同研究報告(研究期間 2011 年 4 月～2012 年 3 月)

#### 【キメラマウス胚を用いた概日時計発生過程のリアルタイムイメージング】

○研究代表者：八木田 和弘 教授(京都府立医科大学大学院医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄 准教授(附属再生実験動物施設)

○研究経過及び研究成果：

概日時計の発生メカニズムは重要なテーマのひとつとなっている。概日時計のリズム発振は受精卵や初期胚には見られず、出生後にはほぼ全ての体細胞で概日時計の発振が見られることから、哺乳類概日時計は発生・胎生期に形成されることが示唆されている。しかし、胎生期のどの時期にどのようなメカニズムで概日時計振動体が形成され、自律振動をはじめるのかは現在まで分かっていない。

これまでに我々は、マウス ES 細胞をモデル系として利用し、細胞分化誘導技術と遺伝子操作技術を駆使した、哺乳類概日時計発生過程の解析を行った。マウス ES 細胞を培養下で分化誘導を行い、ルシフェラーゼを指標とした概日時計振動の発光イメージング法によって、細胞分化過程における概日時計振動の解析に成功した。さらに、一度分化させた細胞を、iPS 細胞作製技術を利用してリプログラミングを誘導し、概日時計振動体の変化を解析した。これらの結果から、概日時計の発生は、細胞ひとつひとつのレベルで自律的にプログラムされていることを明らかにした(Yagita et al, PNAS, 2010)。この結果を踏まえ、さらに、生体レベルでの概日時計の発生を理解するには、「細胞レベルの内在性プログラム」と「環境要因」の関係も含めた統合的研究が必須になる。我々は、概日時計の発生メカニズムを、マウス胚を用いた発生工学とイメージング技術を駆使して、統合的に理解することを目的としている。

平成 23 年度の共同研究では、概日時計をモニターできる蛍光シフェラーゼを用いた発光レポーターを導入した ES 細胞をマウス胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスを作製した。このキメラマウス脳のスライス培養を行い、概日リズムの中核である視交叉上核を発光測定した。その結果、ES 細胞由来の神経細胞に発光が観察され、しかも明瞭な概日リズムを示すことが確認できた。これによって、ES 細胞を利用して生体内における概日時計の成立過程を解析する基盤を構築することに成功した。

○研究成果の公表

<発表論文>

- 1: Chaves I, Nijman RM, Biernat MA, Bajek MI, de Silva AC, Saito S, **Yagita K**, Eker AP, van der Horst GT, The prtorous CPD photolyase rescues a cryptochrome-deficient mammalian circadian clock. *PLoS One*, 6, e23447, 2011

<学会発表>

- 1: 八木田和弘, 細胞分化と概日時計の発生, 第 64 回日本自律神経学会, 秋田, 2011
- 2: 八木田和弘, Circadian clock and cellular differentiation: Development, regeneration and cancer., 第 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ, 横浜, 2011
- 3: **Yagita K**, Chronogenesis and cellular differentiation., Gordon Research Conferences: Chronobiology, Lucca, 2011 (Invited Speaker)

#### 【自己活性化型 Cys-Pro エステルユニットを利用した細胞表面タンパク質の標識法の開発と軟骨前駆細胞の同定への応用】

○研究代表者：川上 徹 准教授(大阪大学蛋白質研究所)

再生医科学研究所共同研究者：開 祐司 教授(生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果：

本研究では、自己活性化型 Cys-Pro エステル(CPE)を利用した細胞表面蛋白質標識法を開発して、新たな細胞標識・同定法として応用することを目的とした(図 1)。そこで、軟骨細胞や骨芽細胞に発現する副甲状腺ホルモンの特異的標識をモデルに選び、標識導入した副甲状腺ホルモン(PTH)リガンドを化学合成した。次いで in situ 標識転移反応により PTH 受容体の特異的に標識することを試みた。



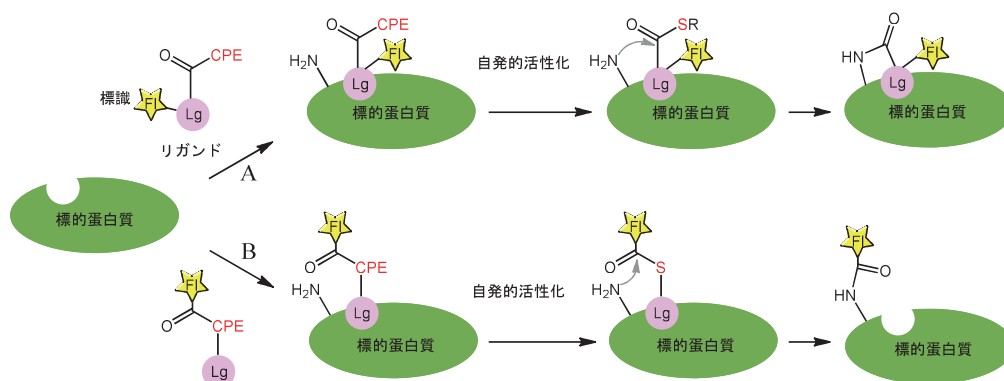


図 1. CPE 型自己活性化法を用いる蛋白質の部位特異的標識

本研究期間においては、まず、CPE 構造を標識転移反応に適するようにデザインした。また、最近報告された PTH 部分ペプチドと PTH 受容体部分ペプチドの共結晶の構造(図 2)から受容体の Lys34 の近傍にリガンドの Glu19 が位置することが判明したので、この位置に自己活性化型構造を導入した蛍光標識 PTH ペプチド(N 末端部分ペプチド)を化学合成した(図 3)。Flag タグを含む PTH 受容体蛋白質を表面に過剰発現させた COS7 細胞に対して本ペプチドを反応させたところ、細胞膜上が蛍光標識され、それは Flag 抗体で可視化した PTH 受容体の局在と一致した。このことから本ペプチドを用いて細胞表面の PTH 受容体を選択的に蛍光標識できることがわかった。今後、標識実験に用いた細胞から PTH 受容体蛋白質を抽出し、共有結合により蛍光標識できているかどうか確認する予定である。

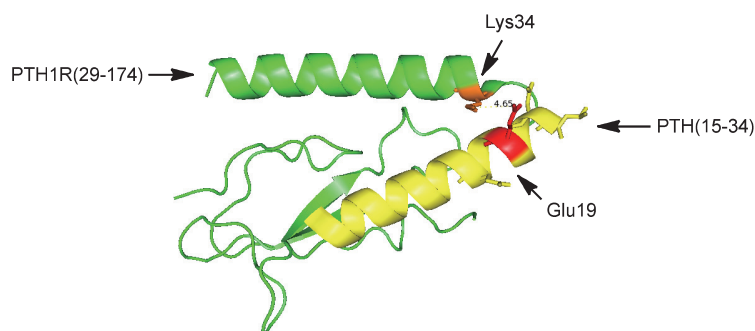


図 2. PTH 受容体 N 末端領域と PTH 部分ペプチドの共結晶構造：A. A. Pioszak, H. E. Xu, *PNAS* 2008, 105, 5034.

#### リガンド結合型

Alexa488-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-Ser-Val-Ser-Glu-Ile- Gln-Leu-Met-His- Asn-  
 Leu-Gly-Lys-His-Leu- Asn-Ser-Met-Glu(CPE)-Arg-  
 Val-Glu-Trp-Leu-Arg- Lys-Lys-Leu-Gln- Asp-  
 Val-His-Asn-Phe-NH<sub>2</sub>

#### 標識転位型

Ser-Val-Ser-Glu-Ile- Gln-Leu-Met-His- Asn-  
 Leu-Gly-Lys-His-Leu- Asn-Ser-Met-Dab(Alexa488-CO-CNGE)-Arg-  
 Val-Glu-Trp-Leu-Arg- Lys-Lys-Leu-Gln- Asp-  
 Val-His-Asn-Phe-NH<sub>2</sub>

図 3. 化学合成した蛍光標識を導入した PTH ペプチド

なお、本研究の発展を目的とした研究課題において、平成 24 年度に学術研究助成基金助成金 基盤研究(C)に採択されたこと、ご報告とともに感謝いたします。

#### ○研究成果の公表

受容体蛋白質が共有結合により標識できていることが確認できた段階で、学会、論文等で発表する。

# 【細胞移植治療を目指したペプチドによる細胞凝集塊の誘導】

○研究代表者：平野 義明 教授(関西大学化学生命工学部)

再生医科学研究所共同研究者：田畑 泰彦 教授(生体材料学分野)

○研究経過及び研究成果：

細胞培養は、生体内では要因が複雑で解析不可能な現象を解析可能にする手段として発達してきた。最も一般的な細胞培養方法は単層培養であるが、しかし本来、細胞は特有の三次元的組織構造の中にあるため、細胞を生体から取り出して単層培養系に移すと、その機能がどの程度失われたのかを知ることは困難である。細胞培養技術においてこのような単層培養系の問題点を部分的に克服し、同時に動物実験に比較して簡便性、操作性を保つ三次元培養法が着目されている。組織から得た細胞を三次元培養すると、細胞間相互作用を通じてより親和性の高い細胞同士が接着し細胞凝集塊を形成する。三次元集合体作製方法にはハンギングドロップ法、旋回培養法などがあるが、細胞凝集塊の大きさ等をコントロールすることが難しい。研究者らは、Poly(Lys-Pro)<sub>n</sub>(n=10~18)含有の培地を細胞上に添加することで細胞凝集塊を形成する化学的手法を発見した。本研究では、細胞移植治療を目指したペプチドによる細胞凝集塊の形成条件について詳細に検討した。

目的のペプチドは鎖長を限定し(Lys-Pro)<sub>n</sub>(n=10, 12, 14, 16)、担体に TrtA-PEG-Resin を用い、縮合剤に DMT-MM を用いた Fmoc 固相法で合成した。ペプチド鎖伸長後、N 末端を脱保護し、95%TFA 水溶液で脱樹脂・脱保護反応を行った。また、合成した粗ペプチドは、透析により単離精製を行った後に、MALDI-TOF-MS 及び HPLC を用いてペプチドの同定、合成の確認を行った。その結果 KP20, KP24, KP28, KP32 を固相法により効率よく得る手法と単離精製が確立できた。

次に合成したペプチド(Lys-Pro)<sub>n</sub>(n=10, 12, 14, 16)とマウス線維芽細胞株(L929)の細胞との相互作用の観察を行い、細胞播種数、細胞接着時間、ペプチドの残基数依存性について検討した。細胞をウェルプレート上に播種し、ペプチド含有培地を添加(0日目とする)することで7日間細胞の様子を観察した。

マウス線維芽細胞(L929)、KP20, KP24, KP28 を用いて細胞凝集塊を誘導したところ、KP20, KP24 のみ細胞凝集塊を確認できた。また、L929 を用いた際、細胞凝集塊を誘導する条件として細胞数  $2.5 \times 10^4$  cells/well(96well plate)、細胞接着時間6時間、ペプチド鎖長 KP20(1.0 mg/mL)が最も良い条件であることがわかった。

L929 を用いたペプチドの細胞毒性試験結果より KP28, KP32 は、細胞毒性があることが認められた。しかし、濃度を小さくした 0.5~0.01 mg/mL では細胞凝集塊を形成したことから、ペプチド鎖長によって細胞凝集塊を形成する濃度が異なることがわかった。また、細胞凝集塊誘導にはペプチドのアミノ酸配列依存性があり、これは、塩基性アミノ酸である Lys の正電荷が影響していると考えられる。

ヒト肝細胞(HepG2)を用いた実験では、先と同様細胞毒性が認められる配列があった。ペプチドを添加し培養4日目で細胞凝集塊の形成が認められた。しかし、L929 とは異なり培養7日目では死細胞が多く見られたことから細胞種によって細胞の初期播種濃度や細胞凝集塊形成までの培養期間が違うことが分かった。

また、HepG2 のペプチド添加までの細胞接着は、6時間よりも24時間の方が細胞凝集塊の形状が球状に近かったことから、細胞接着時間が長いほど細胞凝集塊を形成することがわかった。HepG2 を用いて、アルブミン産出量を定量したところ、ペプチドを添加し細胞凝集塊を作成した方が、通常の培養よりも約3倍から5倍多くなった。このことは、形成した細胞凝集塊が充分機能していることを示唆する結果である。以上より、ペプチドを用いて細胞凝集塊を誘導しても、機能は損なわれないことが考察できる。

L929 や HepG2 以外にも、human Mesenchymal stem cells(MSC)、ヒト肝細胞、軟骨細胞でも、ペプチドを用いて細胞凝集塊を誘導することが可能となった。以上、ペプチドを用いて細胞凝集塊を容易に誘導できることを明らかにした。これらの結果は、細胞移植治療に向けての非常に重要な基礎的知見であると考えられる。

○研究成果の公表

## 講演・展示

1) 平野義明, 再生医療をサポートするペプチド材料, 第10回国際バイオ EXPO 2011/07/01

ポスター展示 2011/06/29-07/01

## 学会発表

1) 平野義明, 伊藤友樹, 稲井公二, 岡勝仁, 細胞凝集塊を誘導する周期性ペプチドの機能評価, 第40回医用高分子シンポジウム, 医用高分子シンポジウム講演要旨集, pp.97 (2011/08/26).

- 2) 平野義明, 伊藤友樹, 稲井公二, 岡勝仁, 細胞凝集塊誘導ペプチドの設計と機能評価, 第60回高分子討論会, 高分子学会予稿集, **60**, 2, pp.5010-11(2011/09/28).
- 3) 平野義明, 伊藤友樹, 田中愛, 田畑泰彦, ペプチドを用いた細胞凝集塊の誘導, 第33回日本バイオマテリアル学会大会, 第33回日本バイオマテリアル学会大会予稿集, pp.394(2011/11/22).

#### 学会発表予定

- 1) Yoshiaki Hirano, Tomoki Ito, Mitsuaki Toda and Yasuhiko Tabata "Functional evaluation of periodic peptide that induces formation of spheroid" 9<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, Chengdu, China, 1-5 June.
- 2) 平野義明, 田中愛, 岡野将之, 田畑泰彦, ペプチドを用いた細胞凝集塊の誘導と機能評価, 第41回医用高分子シンポジウム, (2012/06/26).
- 3) 岡野将之, 田畑泰彦, 平野義明, 細胞集合体誘導ペプチドの合成と評価, 第58回高分子研究発表会 [神戸](2012/07/13).
- 4) 平野義明, 田中愛, 田畑泰彦, ペプチドを用いた細胞集合体の誘導と機能解析, 第39回日本毒性学会学術年会(2012/07/17-19).
- 5) Yoshiaki Hirano, Megumi Tanaka, Yasuhiko Tabata, Functional Evaluation of Peptide that Induces Formation of Cell Spheroid, 6th International Congress of Asian Society of Toxicology(2012/07/18-20).

#### 投稿予定

- 1) Yoshiaki Hirano, Tomoki Ito, and Yasuhiko Tabata, Detection of Spheroid Induce Periodic Peptide, to be submitted.

#### 【機能的神経ネットワーク構築のための生物学および工学】

○研究代表者：鳥光 慶一 主任研究員(NTT 物性科学基礎研究所)

再生医科学研究所共同研究者：岩田 博夫 教授(組織修復材料学分野)

○研究経過及び研究成果：

神経幹細胞の選択的増幅技術とプレナー微小電極アレイ関連技術を融合して学際的な研究を展開した。すなわち、半導体加工技術を駆使してプレナー微小電極アレイを作製し、そのアレイ上で神経系細胞を培養した。その際、細胞の分化やネットワーク形成に適した培養基材の表面設計、および、培養液に添加する最適な分化誘導因子について検討した。こうして得られた神経細胞アレイに対して種々の刺激(生化学的、電気的など)を与え、神経ネットワークに及ぼす影響を調べることに成功した。形態学および生化学的分析に加え、細胞外電位の多点計測を試みた結果、神経ネットワーク構造についてより詳細な洞察を得ることができた。以上の成果は、神経ネットワークに対し、電気的信号による情報の授受を可能とするマシンプレーン・インターフェース技術の発展にとって有意義であると結論した。

○研究成果の公表

関連発表

Sumitomo K, McAllister A, Tamba Y, Kashimura Y, Tanaka A, Shinozaki Y, Torimitsu K. Ca<sup>2+</sup> ion transport through channels formed by  $\alpha$ -hemolysin analyzed using a microwell array on a Si substrate. *Biosens Bioelectron* 31 (1) : 445-50(2012).

#### 【マウス精子形成を支える幹細胞の自己複製・分化と挙動におけるケモカインの寄与】

○研究代表者：吉田 松生 教授(基礎生物学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：長澤 丘司 教授(生体システム制御学分野)

○研究経過及び研究成果：

本研究は、ほ乳類精子幹細胞が局在する血管近傍領域付近の体細胞領域にケモカイン分子種が特異的に発現することを切片上の *in situ* ハイブリダイゼーションによって発見したことを大きな根拠として提案し、CXCL12を含むケモカインが精子形成幹細胞・ニッチシステムにおける機能を解明することを目的として研究を遂行している。

本年度は、CXCL12 遺伝子座に GFP をノックインしたマウスを用いて、CXCL12 発現細胞を3次元的に可視化し、切片(2次元)からは得られない形態と局在を明らかにした。その結果、CXCL12 発現細胞は、血管近傍領域に特徴的な扁平な形態をもって局在し、精子幹細胞集団はこの細胞近辺に偏った局在を示した。世界的に初めて、精子幹細胞の直近でその挙動を制御する「ニッチ細胞」の有力な候補細胞を同定するとともに、その可視化に成功したと考えている。

## ○研究成果の公表

- R. Sugimoto**, Y.-i. Nabeshima and **\*S. Yoshida**. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mechanisms of Development* 128(11-12) : 610-624(2012)
- A. Gely-Pernot, M. Raverdeau, C. Célèbi, C. Dennefeld, B. Feret, M. Klopfenstein, **S. Yoshida**, N. B. Ghyselinck, and **\*M. Mark**. Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor gamma. *Endocrinology* 153(1) : 438-449(2011)
- T. Sato, Y. Aiyama, M. Ishii-Inagaki, **K. Hara**, N. Tsunekawa, K. Harikae, M. Uemura-Kamata, M. Shinomura, X. B. Zhu, S. Maeda, S. Kuwahara-Otani, A. Kudo, H. Kawakami, M. Kanai-Azuma, M. Fujiwara, Y. Miyamae, **S. Yoshida**, M. Seki, M. Kurohmaru and **\*Y. Kanai**. Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of sertoli cells in mouse and hamster testes. *PLoS ONE* 6(12) : e28367(2011)
- Koyanagi S, Hamasaki H, Sakiguchi S, **Hara K**, Ishii Y, Kyuwa S and Yoshikawa Y. Effects of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 deficiency on mouse ova. *Reproduction* (2012), in press

## 総説/図書

- \*S. Yoshida** : Stem cell niche system in mouse spermatogenesis. In **Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Series, “Male Germline Stem Cells : Developmental and Regenerative Potential”** Humana Press, 159-175(2011)
- A. Spradling, **\*M. T. Fuller**, R. E. Braun, and **S. Yoshida** : Germline Stem Cells. In **A Cold Spring Harbor Perspectives in Biology Collection, “Germ Cells”** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1-20(2011)

## 招待講演

- S. Yoshida** : Sperm Stem Cells in the Mouse, **Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, “The Life of a Stem Cell : From Birth to Death”** March 11-16, 2012, Olympic Valley, CA, USA
- S. Yoshida** : Sperm Stem Cell Behaviors In Mouse Testis. **The World Congress on Reproductive Biology**, October 9-11, 2011, Cairns, Australia
- S. Yoshida** : Sperm Stem Cell Competition and the Niche. **Gordon Research Conference, “Mammalian Gametogenesis and Embryogenesis”**, August 21-26, 2011, Waterville Valley, NH, USA
- S. Yoshida** : Sperm Stem Cells in the Mouse Testis. **International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 9th Annual Meeting**, June 15-18, 2011, Toronto, Canada
- S. Yoshida** : Function and Regulation of the Spermatogenic Stem Cells. **The 8th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (PRFS)** May 27-29, 2011, Hong Kong, China
- S. Yoshida** : Stem Cell System in Mammalian Spermatogenesis. **The 2011 Biomodulation Symposium on ‘Biotechnology for Future Era’**, May 26-27, 2011, Seoul National University, Seoul, Korea

その他, 計 16 件

## 【矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析】

○研究代表者：山本 照子 教授(東北大学大学院歯学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：開 祐司 教授(生体分子設計学分野)

○研究経過及び研究成果：

これまでに、正常マウスを用いて、正確で再現性に優れたマウスの歯の移動モデルを確立している。この実験モデルは、6 週齢マウスを用いて、NiTi ワイヤーにより作成した装置を上顎切歯に装着し、初期荷重 10g にて第一臼歯の舌側方向への移動を行なうもので、歯根膜、歯槽骨の改造現象を分子・組織形態学的に解析することが出来る。同時に、本年は以下のように、*Scleraxis* (*Scx*) 発現領域で GFP が検出されるレポーターマウスである *ScxEGFP* Tg を用いて生理的な歯周組織での解析を行った。すなわち、*ScxEGFP* Tg を用いて、2, 4, 6, 8, 及び 12 週齢の歯周組織における *Scx* と Osteopontin, MMP13 の局在を蛍光免疫染色によって解析した。また、近接切片を用いて、TRAP 染色による破骨細胞の局在解析とトリジンブルー染色及び HE 染色による組織染色を行った。更に、*Sox9Cre* の knock-in マウスとレポーターマウスである *Ail4* マウスを交配して *Sox9Cre ; Ail4* を作成し、歯と歯周組織における *Sox9* 陽性細胞の系譜を解析した。非脱灰凍結切片は、粘着フィルムを用いた川本法によって作製した。石灰化組織中の蛋白質の抗原部位は、切片を 0.25 M EDTA/PBS に浸漬し、1 時間の脱灰処理を行って露出させた。



蛍光免疫染色による解析の結果、*ScxGFP Tg* の臼歯とその周辺組織では、歯の萌出前である2週齢において、歯根膜線維芽細胞の一部で GFP の発現が検出された。一方、*Sox9Cre; Ai14* では、2週齢において、歯根膜線維芽細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞、エナメル芽細胞、及び歯髄細胞で蛍光蛋白が検出されたことから、*Sox9* 発現細胞は、歯や歯周組織を構成するほぼ全ての細胞に分化していることが明らかとなった。*ScxGFP Tg* では、歯の萌出に伴って GFP の発現が上昇し、4、6、8、及び12週齢では、大部分の歯根膜線維芽細胞及び象牙芽細胞において、明瞭な GFP の発現が検出された。象牙芽細胞における GFP の発現は、歯冠部では低く、歯根部では高い傾向が認められた。4週齢の ICR マウスで *in situ hybridization* によって *Scx* の発現を解析した場合も、同様の結果が得られた。セメント細胞及び歯槽骨中の骨細胞においては、低いレベルの GFP の発現が検出された。一方、骨芽細胞や *Tnmd* を発現するセメント芽細胞では、GFP の発現はほとんど検出されなかった。MMP13 の局在及び TRAP 陽性の破骨細胞は、共に、各歯根の遠心側の歯槽骨表面に多い傾向が認められ、生理的な歯の移動や挺出による歯根膜の変化が反映されていると考えられた。第一臼歯の近心側歯根では、近心側の歯槽骨表面に MMP13 の局在及び TRAP 陽性の破骨細胞が多かった。*ScxGFP Tg* の歯根膜では、今回解析した全ての週齢の臼歯において、根尖部付近における GFP の発現レベルが低い傾向が認められた。第一臼歯の最も近心の歯根の歯根膜では、4、6、及び8週齢において、GFP の発現が低い傾向が認められたが、12週齢になると、比較的高いレベルで GFP が発現していた。この部位は、臼歯の最も近心側であるため、生理的な力学負荷のかかり方が不安定であると考えられる。第二臼歯の歯根膜では、TRAP 陽性の破骨細胞や MMP13 が局在する歯槽骨表面に結合した領域において、GFP の高い発現が検出された。すなわち、生理的な状態においては、*Scx* の発現は、吸収面の歯根膜で高い傾向が認められた。従って、歯に矯正力のような力学的負荷を加えた場合、歯根膜における *Scx* の発現レベルは、破骨細胞の出現によって歯槽骨の吸収が起こる圧迫側で高く、骨形成が起こる牽引側で低くなることが予想された。

次に Nickel Titanium (NiTi) ワイヤを用いた矯正学的な歯の移動実験と elastic ゴムを用いた Waldo 法における、歯周組織での *Scx* 局在を蛍光免疫染色によって解析した。ともに歯根膜の圧迫側よりも、主に牽引側で強い GFP の発現が見られた。特に Waldo 法を行って 24h 後、矢状断切片において、第一臼歯の遠心根で顕著な差が見られた。牽引側では歯根膜細胞の伸展が見られ GFP の強い発現が見られたのに対し、圧迫側では歯根膜細胞の圧縮が見られた。

更にストレス直後(0min, 15min, 1h, 3h)からの圧迫側と牽引側における GFP の発現レベルを経時的に比較検討したところ、3h 以降でその差が明らかとなった。すなわち、メカニカルストレス下においては、装置を付けていない生理的な状態とは異なり、骨添加の起こる牽引側で *Scx* の高い発現が見られた。また TGF- $\beta$  系列のシグナル分子である Smad2/3 分子のリン酸化が *Scx* の発現上昇に先立って認められた。従って、*Scx* はメカニカルストレスに応答性の遺伝子で、生理的及び矯正的な歯の移動において歯周組織のリモデリングに関与していると考えられる。

現在、*In vitro* において、*Scx* の TGF- $\beta$  依存性を解析するためにラットの抜去歯より分離・培養した歯根膜細胞に TGF- $\beta$ 2 を添加し、*Scx* の発現量を Northern blot などを用いて解析中である。また、*Scx* の遺伝子座に *Cre-recombinase* を knock-in した *ScxCre KI* マウスを作製し、歯や歯周組織の発生、成長過程における *Scx* 陽性細胞の系譜を追跡する実験も進めている。

#### ○研究成果の公表

- 1) 第30回日本骨代謝学会学術集会(発表予定)

日 時：2012年7月19日(木)～21日(土)

演 題：歯根膜における Scleraxis の発現とその制御

Regulation of Scleraxis expression in the periodontal ligament

発表者：滝本 晶 他

- 2) 第13回運動器科学研究会(発表予定)

日 時：2012年9月14日(金)～15日(土)

演 題：矯正的な歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析(仮)

発表者：川津 正慶 他

#### 【精原細胞のニッチとしてのセルトリ細胞の遺伝子発現解析】

○研究代表者：森田 隆 教授(大阪市立大学大学院医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄 准教授(附属再生実験動物施設)



## ○研究経過及び研究成果：

精原細胞は有糸分裂と減数分裂の二種類の分裂形態をとり、さらに精子へと分化、変態を起こす。このような生殖細胞の周囲に存在するセルトリ細胞は生殖細胞に微小環境を与えるニッチとして重要である。我々はいろんな状況におけるセルトリ細胞の遺伝子発現を解析することにより、セルトリ細胞から発せられるシグナルが、常に一定の微小環境を保つものか、あるいは生殖細胞に対して動的に変化するものかを明らかにすることが目的である。

平成 22 年度において、我々は、精巣を分画して得られたセルトリ細胞に強く発現している遺伝子を特定した。それらには、Hvcn1, Endothelin-1, Connexin 43, Slc27A4, Irx-3, Atm, Desmin, Sox9, Cathepsin L, SCF, c-Kit など、これまで、セルトリ細胞で発現が確認されているものも、含まれていた。

我々は、これらの遺伝子について、マウス精巣 RNA から、RT-PCR によって cDNA をクローニング DNA シーケンサでそれぞれの遺伝子の配列を確認した後、in situ hybridization のプローブを作製した。マウス精巣の切片にこれらのプローブをハイブリダイズさせ、RNA の局在を現在、解析中である。

一方、これらのタンパクに対する抗体を用いて、タンパクとしての分布を検討した。実際にセルトリ細胞に特異的に検出されるタンパクとしては、Sox9 が顕著であった。しかし、Sox9 も、減数分裂期の生殖細胞でも発現していることがわかった。さらに、Connexin 43 のタンパクも、細胞間に分布しているのが観察された。

野生型のマウス精巣の他、パキテン期で減数分裂が停止する Dmcl1 ノックアウトマウスの精巣についても、Sox9 などで発現を比較した。Dmcl1 ノックアウトマウスでは、生殖細胞がアポトーシスを起こして死滅するため、精細管には、相対的にセルトリ細胞が多く増殖していることが Sox9 による抗体染色で明らかとなった。今後、他の種々の遺伝子発現の変化、タンパクの局在の変化を追うことにより、セルトリ細胞のニッチとしての機能を解析できると考えられる。

## ○研究成果の公表

Gene Expression of Mouse Sertoli cells(準備中)

## 【脊椎動物の骨格筋の形成・成熟・維持機構の研究】

## ○研究代表者：川上 浩一 教授(国立遺伝学研究所)

再生医科学研究所共同研究者：瀬原 淳子 教授(再生増殖制御学分野)

## ○研究経過及び研究成果：

川上グループで、トランスポゾン Tol2 を用いて GFP が挿入されたトランスジェニックフィッシュを確立し、その中で骨格筋や腱で発現しているラインを川上グループと瀬原グループで解析している。骨格筋で発現する 1 ラインに関して、筋形成に関わることがわかったことから、ほ乳類でも同様のメカニズムが働いているかどうかを調べるためにマウス筋衛星細胞 C2C12 にこの遺伝子に対する siRNA を導入し、筋形成に対する効果を調べたが、C2C12 の筋形成には目立った変化はみられなかった。一方、腱で発現する 2 ラインに関しては、両者の挿入部位を決定したところ、同じファミリーに属する転写因子の上流領域であることが判明し、これらの転写因子がマウスでも類似の発現パターンを示すことがわかった。これらの転写因子の筋形成や腱形成、あるいはこれらの相互作用における役割は不明であることから、それらの役割に関して調べているところである。さらに川上グループで見いだされた、類似の発現パターンを示すトランスジェニックフィッシュも用いて、それら相互の関連を調べている。また、先に同定した遺伝子に関しては、瀬原グループでノックアウトマウスを作成し、解析中である。

## ○研究成果の公表

## &lt;発表論文リスト&gt;

1. Hirata, H., Wen, H., Kawakami, Y., Naganawa, Y., Ogino, K., Yamada, K., Saint-Amant, L., Low, S.E., Cui, W.W., Zhou, W., Sprague, S.M., Asakawa, K., Muto, A., Kawakami, K., and Kuwada, J.Y.(2012) Connexin39.9 is necessary for coordinated activation of slow-twitch muscle and normal behavior in zebrafish. The Journal of Biological Chemistry, 287(2), 1080-1089.
2. Asakawa, K., Higashijima, S.I., and Kawakami, K.(2012) An *mnr2b/hlxb9lb* enhancer trap line that labels spinal and abducens motor neurons in zebrafish. Developmental Dynamics, 241, 327-332
3. Kishimoto, N., Alfaro-Cervello, C., Shimizu, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Nonaka, S., Kawakami, K., Garcia-Verdugo, J.M., and Sawamoto, K.(2011) Migration of neuronal precursors from the telencephalic ventricular zone into the olfactory bulb in adult zebrafish. The Journal of Comparative Neurology, 519, 3549-3565.

4. Mizoguchi, T., Togawa, S., Kawakami, K., and Itoh, M. (2011) Neuron and sensory epithelial cell fate is sequentially determined by Notch signaling in zebrafish lateral line Development. The Journal of Neuroscience, 31, 15522-15530.
5. Muto, A., and Kawakami, K. (2011) Imaging functional neural circuits in zebrafish with a new GCaMP and the Gal4FF-UAS system. Communicative & Integrative Biology, 4, 566-568.
6. Abe, G., Suster, M.L., and Kawakami, K. (2011) Tol2-mediated transgenesis, gene trapping, enhancer trapping, and the Gal4-UAS system. Methods in Cell Biology. 104, 23-49.
7. Suster, M.L., Abe, G., Schouw, A., and Kawakami, K. (2011) Transposon-mediated BAC transgenesis in zebrafish. Nature Protocols, 6, 1998-2021.
8. Wang, H., Bonnet, A., Delfini, M.C., Kawakami, K., Takahashi, Y., and Duprez, D. (2011) Stable, conditional, and muscle-fiber-specific expression of electroporated transgenes in chick limb muscle cells. Developmental Dynamics, 240, 1223-1232.
9. Ikenaga, T., Urban, J.M., Gebhart, N., Hatta, K., Kawakami, K., and Ono, F. (2011) Formation of the spinal network in zebrafish determined by domain-specific Pax genes. The Journal of Comparative Neurology, 519, 1562-1579.
10. Vogalis, F., Shiraki, T., Kojima, D., Wada, Y., Nishiwaki, Y., Jarvinen, J.L., Sugiyama, J., Kawakami, K., Masai, I., Kawamura, S., Fukada, Y., and Lamb, T.D. (2011) Ectopic expression of cone-specific G protein-coupled receptor kinase GRK7 in zebrafish rods leads to lower photosensitivity and altered responses. The Journal of Physiology, 589, 2321-2348.
11. Shakes, L.A., Abe, G., Eltayeb, M.A., Wolf, H.M., Kawakami, K., Chatterjee, P.K. (2011) Generating libraries of iTol2-end insertions at BAC ends using loxP and lox511 Tn10 transposons. BMC Genomics, 12, 351.

<学会発表リスト>

1. Tanino, S., Abe, G., Kawakami, K., Nakamura, H., Funahashi, J.: Essential roll of SOX5 in the semicircular canal development of zebrafish. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. (2011.5.18-21, 沖縄)
2. Lal, P., Kawakami, K.: Genetic dissection of adult zebrafish brain by Tol2 transposon mediated Gal4-UAS system and gene trap and enhancer trap method. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. (2011.5.18-21, 沖縄)
3. Wada, H., Kawakami, K.: Postembryonic development of the lateral line neuromasts in zebrafish. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. (2011.5.18-21, 沖縄)
4. Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K.: Genetic dissection of the hindbrain by the Gal4-UAS system in zebrafish. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. (2011.5.18-21, 沖縄)
5. Kawakami, K.: zTrap and NIGKOF: the databases for Tol2-mediated gene trap/enhancer trap lines and gene-knockout fish lines. Conference on genome engineering 2011 (2011.6.20-22, Singapore)
6. Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K.: GENETIC DISSECTION OF THE HINDBRAIN BY THE Gal4-UAS SYSTEM. 7th European Zebrafish Meeting (2011.7.5-9, Scotland)
7. Muto, A., Kawakami, K.: CALCIUM IMAGING OF THE ZEBRAFISH BRAIN WITH IMPROVED GCAMPS. 7th European Zebrafish Meeting (2011.7.5-9, Scotland)
8. Tsetsckhladze, Z., Canfield, V., Johnson, S., Kawakami, K., Cheng, K.: FUNCTIONAL ASSESSMENT OF HUMAN CODING POLYMORPHISMS IN SLC45A2 USING ORTHOLOGOUS RESCUE (OR) IN ZEBRAFISH. 7th European Zebrafish Meeting (2011.7.5-9, Scotland)
9. Kawakami, K., Abe, G., Asakawa, K., Fukuda, R., Pradeep, L., Muto, A., Takakubo, H., Wada, H.: zTrap and NIGKOF: the databases for gene trap/enhancer trap lines and gene-knockout fish lines. 7th European Zebrafish Meeting (2011.7.5-9, Scotland)
10. Kawakami, K.: The transposon-mediated Gal4-UAS method in zebrafish and calcium imaging with an improved GCaMP. Zebrafish Disease Models 4: Blood, Immunity, Cancer, and Endothelial workshop (2011.7.9-11, Scotland)
11. 浅川和秀, 川上浩一: ゼブラフィッシュ L 型レクチン lman2la は, 体幹運動の発達に必要である. 第 30 回日本糖質学会年会 (2011.7.11-13, 新潟)
12. Mizoguchi, T., Togawa, S., Kawakami, K., and Itoh, M.: Neuron and sensory epithelial cell fate is sequentially determined by Notch signaling in zebrafish lateral line development. The 5th Asia-Oceania Zebrafish Meeting (2011.8.26-29, China)

13. Sato, F., Sato, T., Sakaguchi, K., Arai, H., Kurisaki, T., Kawakami, K., and Sehara-Fujisawa, A.: Roles of Meltrin beta (ADAM 19) in development of peripheral nervous system. The 5th Asia-Oceania Zebrafish Meeting (2011.8.26-29, China)
14. Nagai, H., Kishimoto, N., Shimizu, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Knaut, H., Nonaka, S., Kawakami, K., Sawamoto, K.: The Role of Sdf1/Cxcr4 Chemokine Signaling in Neurovascular Niche within the Adult Zebrafish Telencephalic Ventricular Zone. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
15. Wada, H., Kawakami, K.: Dickkopf controls neuromast size during lateral line development. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
16. Muto, A., Kawakami, K.: Brain Imaging with New GCaMPs. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
17. Lal, P., Kawakami, K.: Genetic dissection of the adult zebrafish brain by the GAL4-UAS system. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
18. Amo, R., Agetsuma, M., Kinoshita, M., Shiraki, T., Higashijima, S., Matsuda, M., Suster, M.L., Kawakami, K., Oshima, T., Aizawa, H., Okamoto, H.: Functional analysis of the habenulo-raphe pathway using genetic manipulation. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
19. Abe, G., Asakawa, K., Ito, A., Fukuda, R., Muto, A., Lal, P., Wada, H., Kawakami, K.: Development of Tol2 transposon mediated gene trap method in zebrafish using MAZ transcription termination site. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
20. Kawakami, K., Abe, G., Asakawa, K., Fukuda, R., Lal, P., Muto, A., Wada, H.: zTrap and NIGKOF: the databases for gene trap/enhancer trap lines and gene-knockout fish lines. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
21. Mizoguchi, T., Togawa, S., Kawakami, K., Ito, M.: Notch signaling regulates neuronal versus sensory epithelial fate choice in the zebrafish lateral line system. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
22. Okigawa, S., Isoda, M., Suster, M.L., Kikuta, H., Kawakami, K., Ito, M.: V2 interneuron development is regulated by multiple Delta-Notch signaling. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
23. Takeuchi, M., Shimizu, T., Kani, S., Bae, Y., Tanabe, K., Kusuda, R., Asakawa, K., Kawakami, K., Hibi, M.: Genetic control for development of cerebellar neurons and neural circuits in zebrafish. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
24. Fukuda, R., Kotani, T., Kawahara, A., Kawakami, K.: G protein  $\alpha$  12/13 is involved in the heart tube formation via S1P signaling. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
25. Nakayama, S., Kamihagi, C., Ikenaga, T., Kawakami, K., Hatta, K.: The Observation of Craniofacial Cartilages and a Single Floor Plate Cell using a Gal4-Enhancer Trap Line. 17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2011.9.8-9, 静岡)
26. 川上浩一, 阿部玄武, 浅川和秀, 福田隆一, Lal Pradeep, 武藤彩, 中井淳一: トランスポゾンを用いた遺伝子トラップ法による脳機能の遺伝学的解剖. 第34回日本神経科学大会 (2011.9.14-17, 神奈川)
27. 武藤彩, 中井淳一, 川上浩一: ゼブラフィッシュ稚魚視覚系の脳機能カルシウムイメージング. 第34回日本神経科学大会 (2011.9.14-17, 神奈川)
28. 岸本憲人, 清水耕平, 永井秀人, 浅川和秀, 浦崎明宏, Holger Knaut, 野中茂紀, 川上浩一, 澤本和延: ゼブラフィッシュ成魚の脳室壁付近における神経-血管ニッチ. 第34回日本神経科学大会 (2011.9.14-17, 神奈川)
29. 浅川和秀, 阿部玄武, 川上浩一: ゼブラフィッシュを用いた後脳運動制御機能の遺伝学的解剖. 第34回日本神経科学大会 (2011.9.14-17, 神奈川)
30. 天羽龍之介, 揚妻正和, 木下雅恵, 白木利幸, 東島眞一, 松田勝, Maximiliano L Suster, 川上浩一, 大島登志男, 相澤英紀, 岡本仁: 手綱核の機能解析に向けたゼブラフィッシュ内側及び外側手綱核相同領域の遺伝学的操作. 第34回日本神経科学大会 (2011.9.14-17, 神奈川)
31. Asakawa, K., Kawakami, K.: The Role of //Iman2la//, an L-type Lectin Gene, in the Escape Behavior in Zebrafish. 2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology. (2011.11.9-12, USA)
32. Asakawa, K., Abe, G., Kawakami, K.: Genetic dissection of the hindbrain by the Gal4-UAS system in zebrafish. SOCIETY FOR NEUROSCIENCE 2011 (2011.11.12-16, USA)
33. Muto, A., Nakai, J., Kawakami, K.: Functional brain imaging with improved GCaMPs in zebrafish. SOCIETY FOR NEURO-

SCIENCE 2011 (2011.11.12-16, USA)

34. Okigawa, S., Isoda, M., Suster, M., Kikuta, H., Higashijima, S., Kawakami, K., Ito, M.: Different combinations of Notch ligands are involved in the V2 interneuron development. 第34回日本分子生物学会年会(2011.12.13-16, 神奈川)
35. Kishimoto, N., Shimizu, K., Nagai, H., Asakawa, K., Urasaki, A., Nonaka, S., Kawakami, K., Sawamoto, K.: Zebrafish as a model for studying adult neurogenesis and neuronal regeneration. 第34回日本分子生物学会年会(2011.12.13-16, 神奈川)
36. 黒木あづさ, 谷田部春香, 水野沙耶香, 川上浩一, 河村正二, 藤原晴彦: 配列特異的遺伝子導入ツールとしての LINE:28S rDNA 標的的特異的 LINE・R2OI による外来遺伝子導入. 第34回日本分子生物学会年会(2011.12.13-16, 神奈川)
37. Fukuda, R., Kotani, T., Kawahara, A., Kawakami, K.: G protein alpha 12/13 is involved in the heart tube formation via S1P signaling. 第34回日本分子生物学会年会(2011.12.13-16, 神奈川)
38. 川上浩一: ゼブラフィッシュにおけるトランスポゾンを用いた方法論の開発とその機能的神経回路研究への応用. 認識と形成研究会 2011(2012.1.21-22, 静岡)
39. Kawakami, K.: Transposon-mediated genetic methods in zebrafish and their applications to the study of functional neural circuits. FURANO CONFERENCE.(2012.3.4-8, 北海道)

#### 【腱、軟骨の再生を促す分子ネットワークの解明と応用】

○研究代表者: 浅原 弘嗣 教授(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

再生医科学研究所共同研究者: 戸口田 淳也 教授(組織再生応用分野)

○研究経過及び研究成果:

これまでに我々は軟骨、腱および筋肉の発生・分化に関与する遺伝子を同定するために、約 1,600 の転写制御因子の Whole mount *in situ* hybridization (WISH) データベース “EMBRYS” を構築しているが(Yokoyama et al., 2009), EMBRYS のデータより軟骨細胞で発現する遺伝子を再検索した結果、軟骨分化において発現する転写因子として Fox ファミリー遺伝子を同定した。これら遺伝子の軟骨分化における *in vivo* での機能を明らかにするために、ノックアウトマウスの作製準備を現在行っている。

我々は軟骨細胞特異的な miRNA である miR-140 を同定し、軟骨分化および関節炎における機能をノックアウトマウスの解析により明らかにしてきたが(Miyaki et al., 2009), この miR-140 の発現制御メカニズムを明らかにするために、ルシフェラーゼアッセイおよびトランスジェニックマウスによる解析を行った。その結果、miR-140 の発現を制御する約 700bp のエンハンサー領域を同定した(Yamashita et al., リバイス中)。また、軟骨細胞のマスター遺伝子である SOX9 の下流にある miRNA を同定するために、軟骨細胞における SOX9 の過剰発現により発現上昇する miRNA をスクリーニングした。その結果、miR-140 と新規の miRNA を同定した。この miRNA は、軟骨細胞で発現が高く、過剰発現により炎症性サイトカインの発現を抑えることが明らかになった。今後は当該 miRNA の軟骨分化における機能について調査する。

WISH データベースより腱に発現する転写因子としてホメオボックス遺伝子である Mohawk (Mkx) を同定し、ノックアウトマウスを作製・解析した結果、腱の低形成が観察され、Mkx が腱分化に重要な転写因子であることを示した(Ito et al., 2010)。さらにこの転写因子の腱発生・再生における機能について明らかにするために、その標的遺伝子のスクリーニングを、ノックアウトマウスを用いたマイクロアレイにより試みた。その結果、Mkx が軟骨細胞分化に関わる遺伝子を抑制している可能性が示唆され、現在詳細な解析を行っている。

○研究成果の公表

1. Ito, Y., Toriuchi, N., Yoshitaka, T., Ueno-Kudoh, H., Sato, T., Yokoyama, S., Nishida, K., Akimoto, T., Takahashi, M., Miyaki, S., et al. (2010). The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. Proc Natl Acad Sci USA.
2. Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S.P., Higashiyama, R., Inoue, A., Kato, Y., Sato, T., Lotz, M.K., and Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. Arthritis Rheum 60, 2723-2730.
3. Yokoyama, S., Ito, Y., Ueno-Kudoh, H., Shimizu, H., Uchibe, K., Albin, S., Mitsuoka, K., Miyaki, S., Kiso, M., Nagai, A., et al. (2009). A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP 58. Dev Cell 17, 836-848.
4. Yamashita, S. et al. (2012). リバイス中

## 2012 年度共同研究課題一覧

## ○短期研究課題

| 研 究 代 表 者                                | 再生医科学研究所共同研究者            | 研 究 課 題                                            |
|------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------|
| 西尾 健資 助教<br>(京都大学大学院医学研究科)               | 中村 達雄 准教授<br>(臓器再建応用分野)  | 慢性期脊髄損傷の根治的治療法の確立                                  |
| 油形 公則 特任助教<br>(徳島大学病院 整形外科)              | 宿南 知佐 准教授<br>(生体分子設計学分野) | 軟骨特異的分子 Chondromodulin-I を用いた骨延長術の促進               |
| 長船 健二 准教授<br>(京都大学 iPS 細胞研究所)            | 岩田 博夫 教授<br>(組織修復材料学分野)  | 膵臓β細胞とα細胞からなる組織の再構築と再構築組織内での膵細胞の機能評価               |
| 松本 卓也 教授<br>(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)           | 山本 雅哉 准教授<br>(生体材料学分野)   | 機能的なハイドロゲルを用いた組織周囲環境の再現と組織形態変化の検討                  |
| 川上 浩一 教授<br>(国立遺伝学研究所)                   | 瀬原 淳子 教授<br>(再生増殖制御学分野)  | 神経・グリア相互作用に基づく神経回路形成とその維持機構の解明                     |
| 柿沼志津子 チームリーダー<br>(放射線医学総合研究所放射線防護研究センター) | 藤本 真慈 助教<br>(細胞機能調節学分野)  | Mlh1 欠損マウスの胸腺および脾臓に発生する2種類のリンパ腫における胎児期被ばくの影響       |
| 大木理恵子 研究員<br>(国立がん研究センター研究所)             | 角 昭一郎 准教授<br>(器官形成応用分野)  | 膵島移植効率向上を目指した移植膵島における膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制 |
| 八木田和弘 教授<br>(京都府立医科大学大学院医学研究科)           | 近藤 玄 准教授<br>(附属再生実験動物施設) | キメラマウスを用いた概日時計成立メカニズムの解明                           |
| 近藤 亨 教授<br>(北海道大学遺伝子病制御研究所)              | 加藤 友久 講師<br>(組織再生応用分野)   | 人工癌幹細胞を用いた上皮-間葉移行能力関連因子群の解析                        |
| 加藤 功一 教授<br>(広島大学大学院医歯薬保健学研究科)           | 岩田 博夫 教授<br>(組織修復材料学分野)  | 上皮間葉相互作用解析のためのマイクロパターン化培養基材の設計                     |

## ○長期研究課題(2011 年度～2013 年度)

| 研 究 代 表 者              | 再生医科学研究所共同研究者             | 研 究 課 題                               |
|------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 吉田 松生 教授<br>(基礎生物学研究所) | 長澤 丘司 教授<br>(生体システム制御学分野) | マウス精子形成を支える幹細胞の自己複製・分化と挙動におけるケモカインの寄与 |

## ○長期研究課題(2010 年度～2012 年度)

| 研 究 代 表 者                   | 再生医科学研究所共同研究者            | 研 究 課 題                    |
|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 山本 照子 教授<br>(東北大学大学院歯学研究科)  | 開 祐司 教授<br>(生体分子設計学分野)   | 矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜幹細胞ニッチの解析  |
| 森田 隆 教授<br>(大阪市立大学大学院医学研究科) | 近藤 玄 准教授<br>(附属再生実験動物施設) | 精原細胞のニッチとしてのセルトリ細胞の遺伝子発現解析 |



## 6. 協議員・教職員・その他構成員名簿

(平成25年1月1日現在)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所協議員(所外) ◆

小 西 郁 生 (京都大学大学院医学研究科教授)  
長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)  
吉 崎 武 尚 (京都大学大学院工学研究科教授)  
中 部 主 敬 (京都大学大学院工学研究科教授)  
上 村 匡 (京都大学大学院生命科学研究科教授)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所運営委員(所外) ◆

大 隅 典 子 (東北大学大学院医学系研究科教授)  
妙 中 義 之 (国立循環器病研究センター研究所副所長)  
高 戸 毅 (東京大学大学院医学系研究科教授)  
長 田 重 一 (京都大学大学院医学研究科教授)  
西 川 伸 一 (理化学研究所発生・再生科学総合研究センター副センター長  
幹細胞研究グループグループディレクター)  
西 田 幸 二 (大阪大学大学院医学系研究科教授)  
月 田 早智子 (大阪大学大学院生命機能研究科教授)  
黒 坂 昌 弘 (神戸大学大学院医学研究科教授)

### ◆ 京都大学再生医科学研究所教職員等 ◆

所長(兼): 岩 田 博 夫 副所長(兼): 開 祐 司、戸口田 淳 也

### ■ 生体機能学研究部門 ■

#### 〈細胞機能調節学分野〉

准教授: 細川暢子 特定准教授(白眉)(兼: 白眉センター): 山崎正幸 事務補佐員: 今井飛鳥  
大学院生: 藤森 力, 小幡晃一  
講師: 平芳一法 研究員(研究機関): 法邑賢一  
助教: 藤本真慈

#### 〈生体微細構造学分野〉

(欠員中)

#### 〈生体機能調節学分野〉

客員教授: 坂口志文 助教: 伊藤能永 講師(非常勤): 坂口教子, 大倉永也 事務補佐員: 小長谷菜美  
教務補佐員: 松浦真由美 大学院生: 大崎一直

#### 〈生体システム制御学分野〉

教授: 長澤丘司 助教: 杉山立樹 研究員(学術支援): 尾松芳樹 事務補佐員: 笹川郁子 技術補佐員: 西本千晃  
特定研究員(G-COE): △中川俊徳 大学院生: 下戸 学, 金成香奈子, 清家正成

#### 〈生体再建学分野(国内客員)〉

(欠員中)

## ■ 生体組織工学研究部門 ■

### 〈生体分子設計学分野〉

教授：開 祐司 准教授：宿南知佐 講師(非常勤)：近藤 淳，鄭 雄一，小守壽文，池川志郎

特定研究員(学術支援)：滝本 晶 技術補佐員：杉山弘美 大学院生：郭 龍

研究生：杉本由紀，島村仁子 特別研究学生：川津正慶 日本学術振興会特別研究員：山下 寛

### 〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 准教授：山本雅哉 講師(非常勤)：小川佳宏，中村雅也，金田安史

事務補佐員：岩根由依 技術補佐員：吉田久子 大学院生：高本智紹，齊藤高志，戸田裕之，田島脩平，KIM Yanghee，河井可奈江，岡本竜弥，田村 亮，平井健次郎，郡司周太郎，隅田 仁，中村陽子，古谷洋之，佐藤圭祐，上田真澄，村上政広，高堂泰輔，達富幹生，内藤孝二郎 学部生：有本晃佑，永田純平，西本慶喜

受託研究員：豊島永実子，駒田行哉，北澤 学，須田 清，尾崎千紗，門脇功治，小尾奈緒子

特定研究員：上杉佳子，松井 誠 共同研究研究担当者：三田恵理 民間等共同研究員：先崎尊博，小河賢史

日本学術振興会外国人特別研究員：TAN Guak Kim 特別研究学生：中島 大

日本学術振興会特別研究員：戸田裕之

外国人共同研究者：THITIWUTHIKIAT Piyanuch，CHITRATTHA Sasiprapa，YODKHUM Kotchamon

その他：大倉隆介，假屋太郎，酒井成貴，堀江理恵，岡野将之，迎田 生

### 〈組織修復材料学分野〉

教授：岩田博夫 助教：有馬祐介 講師(非常勤)：岡崎正之，児玉智信

事務補佐員：鈴木義子 教務補佐員：藤本七恵

大学院生：EGAWA Edgar Yuji，小長谷周平，竹本直紘，Ian Torao Hoffecker，相山 裕，板垣 亮，出野 翔，西村勇人

学部生：桑原 令，小松光荣，松井利樹 特定研究員(学術支援)：北村成史

研究員(学術支援)：中井隆介 研究員(産官学連携)：Nguyen Minh Luan，児玉智信，白水泰昌

日本学術振興会特別研究員：小長谷周平，竹本直紘

### 〈生体物性学分野(国内客員)〉

教授：佐藤正明

## ■ 再生統御学研究部門 ■

### 〈再生誘導研究分野〉

(欠員中)

### 〈再生増殖制御学分野〉

教授：瀬原淳子 助教：飯田敦夫 特定研究員(科学研究)：栗崎智美 特定研究員(学術支援)：佐藤文規

特定研究員(G-COE)：佐藤貴彦 事務補佐員：倉澤祥子 技術補佐員：黒田信子，寒川裕之，坂口和弥，木村剛隆

教務補佐員：坂口大史，西邨大吾

大学院生：平向洋介，荒井宏行，庄子栄美，亀崎青沙，友澤杏奈

### 〈再生免疫学分野〉

教授：河本 宏 助教：増田喬子 大学院生：前田卓也 事務補佐員：藤井絵理香

## ■ 再生医学応用研究部門 ■

### 〈生体修復応用分野〉

教授：高橋 淳 特定拠点助教：◇森實飛鳥 特定研究員(産官学連携)：西村周泰，菊地哲広

特定研究員：土井大輔，元野 誠 研究員：山崎絵海，福家有子 事務補佐員：五味淵淑子

教務補佐員：窪田 慶 大学院生：吉川 綾，五百蔵義彦，小芝 泰，佐俣文平，勝川美都子 学部生：中島悠介

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 講師：加藤友久 特定研究員(G-COE)：金 永輝

研修員：小泉智恵 事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵 技術補佐員：永田早苗，上田路子

大学院生：早川和男，玉置さくら，Elalaf Hassan，小林恭介，松本佳久，横山宏司，福田 誠，日根野 翔，高原直子

〈器官形成応用分野〉

准教授：角 昭一郎 講師(非常勤)：砂村眞琴，日裏彰人，小川知彦，白水泰昌

事務補佐員：菊池裕子 研究生：星野順一 研修員：柳井伍一

〈臓器再建応用分野〉

准教授：中村達雄 講師(非常勤)：早川克己，稲田有史，堀 義生，茂野啓二，萩原明於

事務補佐員：矢延聡枝 技術補佐員：石田久恵 大学院生：木田直樹，本多通孝，小島史嗣，若槻麻里子，濱路政嗣

研究生：町口敏彦，畑山敬秀，瀬川篤典，宇治正人，金子真弓

研修員：井上祐利，中田 顕 特別研究学生：笹内杏子，中村浩樹，山口雄一郎，柳 束

〈再生医学応用流動分野〉

(欠員中)

■ 幹細胞研究部門 ■

〈発生分化研究分野〉

教授：中辻憲夫 准教授：中馬新一郎 特定研究員(NEDO)：\*細川美穂子

教務補佐員：森部江美子 技術補佐員：田中ます子 事務補佐員：酒井睦美，廣富ひとみ

大学院生：熊谷英明，望月綾子，林 瑛理，刀谷在美

〈胚性幹細胞研究分野〉

准教授：末盛博文 連携准教授：佐藤恵子 教授(客員)：高橋恒夫 准教授(客員)：古江－楠田美保

特定講師(特別教育研究)：川瀬栄八郎 特定研究員(特別教育研究)(CPC 主任)：高田 圭

特定研究員(厚生医薬品実用)：平井雅子 特定研究員(厚生科研)：宮崎隆道 特定研究員(科学研究)：山内香織

技術補佐員：濱生麻里 教務補佐員：采女久実子，後藤律子 大学院生：武内大輝，中川史之

〈幹細胞分化制御研究分野〉

教授：山下 潤 研究員(iPS 細胞研究)：◇武田匡史

大学院生：松永太一，福島弘之，劉 娅婧，皆川朋皓，楊 振南，松家未来

教務補佐員：村山千里，志野瑞穂，片山志織，吉岡美樹 研修員：星野託広

〈幹細胞加工研究分野〉

准教授：多田 高 外国人共同研究者：Sun Liang Tso 研究員：福地恵美，平野邦生

■ 附属再生実験動物施設 ■

施設長(兼)：長澤丘司 副施設長(兼)：戸口田淳也 准教授：近藤 玄 技術職員：出口央士，渡邊仁美，萩原智幸

技能補佐員：古卿智英，石丸英典，西山尚之，柴田 豊，森本幸子，竹明フサ，向 一哲，永井智美，佐々木 勉，

大江 強，大場雅之，竹内 宏，廣川真人 労務補佐員：片山龍一 事務補佐員：北澤志津江

## ■ 附属ナノ再生医工学研究センター ■

センター長(兼)：安達泰治

### 〈ナノバイオプロセス研究領域〉

教授：楠見明弘 准教授：\*鈴木健一 特任講師：\*藤原敬宏 助教：笠井倫志

特定研究員(WPI)：\*Rahul Chadda 大学院生：後神秀考, 白居祐希, 角山貴昭, 吉田謙太, 陳 莉敏, 宮原愛美, 石川慶郎, 守谷隆一, 大山勇己, 渡辺雄介

教務補佐員：\*坪井久恵, \*土方博子, \*廣澤幸一朗, \*Ankita Chadda, \*平本葉央, \*入谷真由子

研究員：\*柴田明裕, \*根本悠宇里, \*幸重美津子, \*周 鵬

日本学術振興会外国人特別研究員：\*Zsombor Koszegi 外国人共同研究員：\*刘 安安

### 〈シミュレーション医工学研究領域〉

(欠員中)

### 〈ナノバイオメカニズム研究領域〉

助教：都賀谷紀宏

### 〈バイオメカニクス研究領域〉

教授：安達泰治 准教授：井上康博 講師(非常勤)：上岡 寛, 木戸秋 悟, 大橋俊朗, 森下喜弘

特定研究員(最先端・次世代研究)：韓 成雄 教育研究機関研究員：岡田正弘

教務補佐員：須長純子, 金井浩美 事務補佐員：嶋田浩子

大学院生：木田直樹, 奥田 覚, 近藤由章, 鈴木健介, 森田恭平, 竹中健太郎, 藤井徹矢, 藤本博志, 牧 功一郎

学部生：笠井拓矢, 田中孝明, 玉木嵩人, 渡辺惟史

### 〈再生医工学研究領域 (外国人客員)〉

(欠員中)

## ■ 技術部 ■

再雇用職員：松下隆壽, 小岸久美子

## ■ 事務部 ■

事務長：森 勝二

総務掛長：山中茂弘 主任：服部和枝 事務補佐員：戸倉理恵子 派遣職員：前田亜矢乃, 山本陽子

財務掛長：田井睦之 事務職員：岡崎裕輔 事務補佐員：緒方康子

※：物質—細胞統合システム拠点所属 ◇：iPS 細胞研究所所属

△：医学研究科所属

---

---

*Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences*  
*Kyoto University 2012*

京都大学再生医科学研究所年報 2012

2013 年 4 月 19 日 印刷 2013 年 4 月 26 日発行

発 行 京都大学再生医科学研究所

京都市左京区聖護院川原町53 〒606-8507

印 刷 ㈱北斗プリント社

---

---



