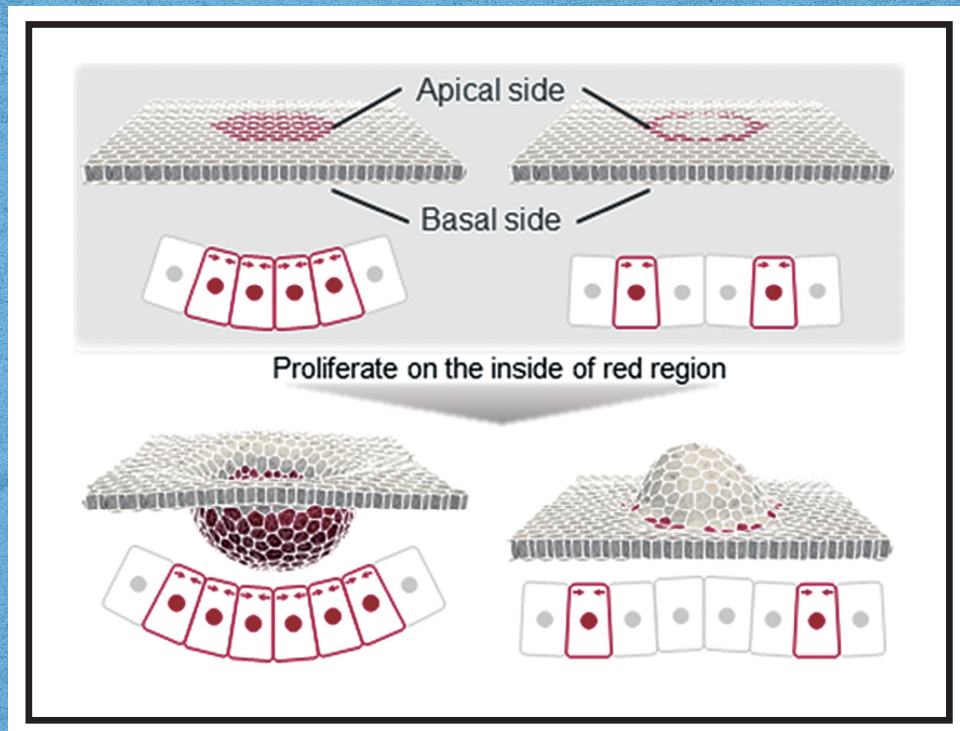


京都大学

再生医科学研究所年報

Annual Report of the Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University



〈第17巻〉

2014
平成26年

表紙写真

「上皮シートの面外変形シミュレーション」

上皮の立体的器官の形成には、発生過程における上皮シートの面外変形が必要不可欠である。本研究では、上皮組織の多細胞力学シミュレーションによって、面外変形に関わる力学機構の1つを明らかにした。上皮シートにおける頂端収縮する細胞配置のパターンに応じて、面外変形として知られる陥入(左図)や膨出(右図)が生じる。いずれにおいても、頂端収縮する細胞はくさび形に変形し、陥入か膨出かが現れる違いには、これら細胞の配置パターンが重要である。(バイオメカニクス研究領域)

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)	19
生 体 組 織 工 学 研 究 部 門	
生体分子設計学分野 (教 授 開 祐司)	24
生 体 材 料 学 分 野 (教 授 田畑 泰彦)	32
組織修復材料学分野 (教 授 岩田 博夫)	53
生 体 物 性 学 分 野 (客員教授 吉田 松生)	59
再 生 統 御 学 研 究 部 門	
再生増殖制御学分野 (教 授 瀬原 淳子)	66
再 生 免 疫 学 分 野 (教 授 河本 宏)	74
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)	85
器 官 形 成 応 用 分 野 (准教授 角 昭一郎)	93
臓 器 再 建 応 用 分 野 (准教授 中村 達雄)	97
幹 細 胞 研 究 部 門	
発 生 分 化 研 究 分 野 (教 授 中辻 憲夫)	103
胚 性 幹 細 胞 研 究 分 野 (准教授 末盛 博文)	107
幹細胞分化制御研究分野 (教 授 山下 潤)	111
幹細胞加工研究分野 (准教授 多田 高)	119
附 属 再 生 実 験 動 物 施 設 (教 授 近藤 玄)	122
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)	126
ナノバイオメカニズム研究領域 (助 教 都賀谷紀宏)	131
バイオメカニクス研究領域 (教 授 安達 泰治)	133
技 術 部	142
4. 学 術 集 会	143
5. 共 同 研 究	150
6. 協議員・教職員・その他構成員名簿	167

1. 巻 頭 言

少子高齢社会を迎え、大学も大きな変革を求められています。例えば国立大学法人になった2004年以来、毎年1~1.3%の大学改革促進係数が大学に付加されており運営費交付金が減額されてきました。京都大学では運営費交付金で教職員の人件費の総てを賄うことが困難になり、2014年度前期に向う10年間の部局ごとの定員削減計画が発表され、2014年度後期から実施されています。研究面でも、運営費交付金はもとより多くの競争的資金も税金で賄われていることから、国民に対する説明責任をはたすことが求められています。

再生医科学研究所では、2017年度から2020年度にかけて3名の教員を削減する必要があります。また教員が協力講座関係を結んでいる研究科では、定員削減のため大学院教育さらに学部教育でも教員数の減少により多くの困難に直面することになり、今後研究所の教員に教育の支援を行うことが求められます。“国民に対する説明責任”ですが、再生医療がマスコミにも多く取り上げられてきたこともあり、幸い“国民に対する説明責任”をはたすことが比較的容易な研究所でした。

社会が縮みつつある中ますます組織の運営は難しくなっています。大きな話として文部科学省は、全国に86校ある国立大学を3つの類型、すなわち、地域活性化・特定分野重点支援型、特定分野重点支援拠点型、世界最高水準の教育研究拠点型、に分類してそれぞれに応じた資源分配を行うとのことです。京都大学では大学執行部が3番目の世界最高水準の教育研究拠点型に分類されるよう努力されています。再生医科学研究所は教員数40名弱の研究所です。再生医科学という限られた分野ですが、この人数で今後とも世界最高水準の教育研究を維持し、さらに新分野を開拓していくことが求められています。幸いお隣に学問的基盤また研究機器に多くの共通性のあるウイルス研究所があります。この数年来研究所運営について話し合ってきました。それぞれの研究所から教員を切り出し「多階層にわたる複雑な生命現象を理解する」ための第三の研究グループを共同で設立することに合意いたしました。

私は2014年度末をもって定年いたします。4年間の在任中数多くの会議に出席しましたが、多くの重要なことが継続審議になり、また、決定されたもののその実行が将来に持ち越されることになってしまいました。例えば、定員削減と年俸制の導入、教員人事を行う学域・学系制度の導入、学内資源再分配における学長のリーダーシップ強化、研究所の組織再編、共同利用・共同研究拠点の再認定等があります。次期所長に就任される開教授には多くの宿題を残すことになってしまったことを申し訳なく思っております。所員の方々には社会情勢また大学が置かれた環境に十分配慮いただき、今後とも研究所の運営に協力いただきたく思います。先輩の方々また外部の方々には今後とも変わらず再生医科学研究所へのご助言さらにご支援をいただけますよう切にお願い申し上げます。

平成27年3月

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研究」を中心とする医用高分子センターとして設置され、平成2年6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、工学などの研究者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27年1月1日現在)

現 員	教 授	准教授	講 師	助 教	小 計	特任教授	特任講師	特任助教	合 計
	11(4)	8(1)	1	11	31(5)	1	1	2	35(5)

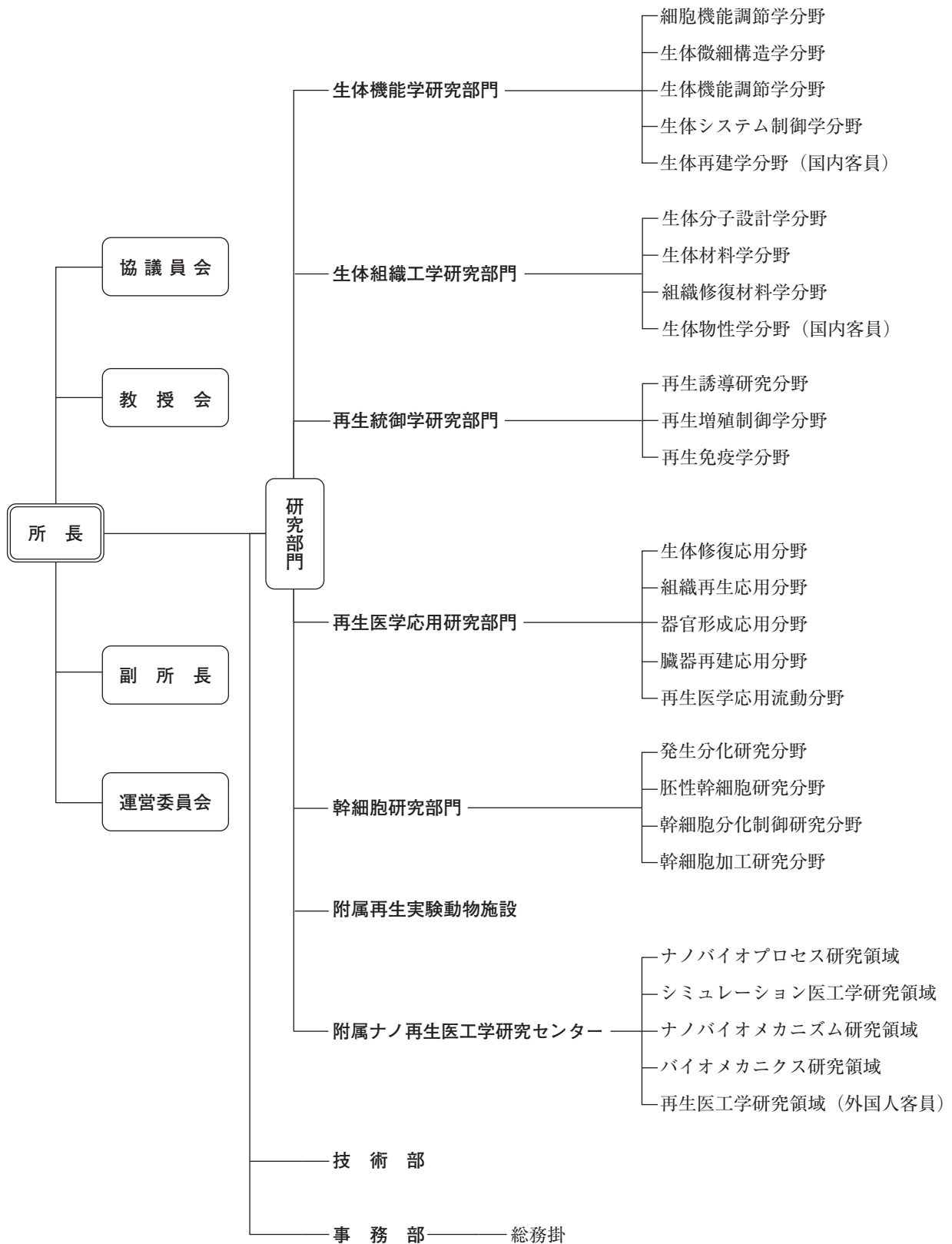
() 内は客員で外数

(2) 大学院生・研修員・研究生等 (平成27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
83	5	6	0

2-3 組織図

(平成 27 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. タンパク質品質管理機構の研究：小胞体におけるタンパク質の生合成と分解

細胞機能調節学分野・細川 G では、分子シャペロンタンパク質やレクチンの機能解析を中心に、再生現象の分子基盤とも言うべきタンパク質の生合成・再生・品質管理の機構について研究を進めている。

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い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こと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。

小胞体で生合成されたタンパク質は、シャペロンタンパク質などの助けを借りて、正しくフォールドした機能的なタンパク質となる(図1)。ところが、小胞体ストレスと呼ばれる不都合な環境にさらされると、タンパク質のフォールディングが阻害され、場合によっては一旦フォールドしたタンパク質であっても、高次構造異常をきたす

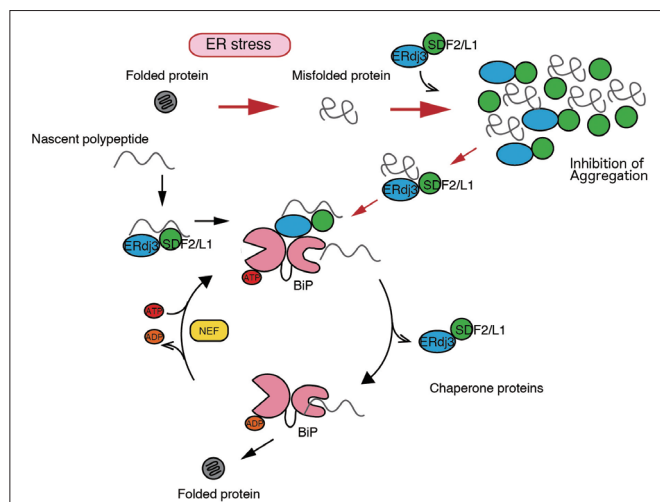


図1 哺乳類小胞体のシャペロンタンパク質

代表的な小胞体シャペロン BiP と、これを補助するシャペロン系の模式図。生合成されたタンパク質のフォールディング、小胞体ストレス環境下でミスフォールドしたタンパク質の凝集抑制、変性したタンパク質の再生をシャペロンタンパク質が助けている。

Figure 1 Chaperone proteins in the mammalian ER

BiP is a major chaperone in the mammalian ER, and other chaperone proteins collaborate with BiP. Chaperones assist the folding of nascent polypeptides, but adverse conditions called ER stress evoke protein misfolding. Proteins with non-native conformations are prone to aggregate, and chaperone proteins inhibit aggregation formation and help the refolding of these aberrant conformers.

ことがある。ミスフォールドしたタンパク質は、凝集体を形成しやすく細胞機能を障害する。このようなミスフォールドタンパク質の凝集を防ぎ再生させることも、シャペロンタンパク質の重要な機能である。BiP は代表的な小胞体シャペロンタンパク質で、ERdj3 は BiP の機能を助けるコシャペロンである。最近私たちは、SDF2 及び SDF2 L1 と名付けられたタンパク質が ERdj3 と複合体を形成することを明らかにした。この複合体は、未成熟な、あるいは変性したタンパク質を BiP へと受け渡すとともに、小胞体ストレス時などのように BiP のシャペロン機能が飽和した場合に、ミスフォールドタンパク質の凝集を抑制している可能性を示す結果を得た(図1)。(文責：細川)

2. アンチトリプシン凝集体構造の形成とその毒性

我々の血液中には、アンチトリプシンというセリンプロテアーゼ阻害タンパク質が1~3.5g/L ものレベルで大量に存在している。その機能は、炎症時に好中球が分泌するエラスターゼを阻害することであり、エラスターゼが我々の肺組織を誤って攻撃することから護っている。しかしながら欧米では、アンチトリプシンの遺伝子に家族性変異を保持している者が少なくなく(有名な Z 変異は Caucasian の 4% が heterozygote, 0.1% が homozygote. ちなみに Mongoloid ではレアな変異)、アンチトリプシンが肝臓で凝集し蓄積してしまう。その結果、肝硬変が引き起こされる。また、血中へのアンチトリプシン分泌量が低下し肺気腫が引き起こされる。これら疾患はアンチトリプシン欠損症と総称される。本疾患は、タンパク質の折りたたみが正しく行われなことを原因としており、アルツハイマー病やパーキンソン病などで知られるタンパク質凝集性疾患の1つである。私の研究の姿勢は、これらタンパク質の凝集がどの様に引き起こされるのかを分子レベルで観察し、治療や予防に向けたストラテジーを構築することであり、現在はアンチトリプシン欠損症にフォーカスしている。

アンチトリプシンがどのように凝集体を形成するのかについて、X線結晶構造解析をベースとし検討を行なった結果、アンチトリプシンは単一のタンパク質でありながら、少なくとも3種類のメカニズムで凝集する事が明らかとなった。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交換し合うことで正常な構

造と似通った構造の形成を実現していた。そのタンパク質構造としての異常性の欠如は、凝集体が細胞内で小胞体ストレスを引き起こさず安定に蓄積する理由として妥当と考えられた。また、それら凝集体のうち1つが、実際の肝硬変を引き起こした患者の細胞内凝集体に多く含まれていることを示唆するデータが得られた。その後、哺乳類細胞、酵母を用いた実験でも、特定の凝集体が細胞内に蓄積しやすいことが示された。この特定の凝集体構造をベースとし、細胞内での凝集体形成を削減する薬剤のデザインがケンブリッジ大学にて行われ、その効果が最近見出されつつある(共同研究)。

最近の興味は凝集体構造の成長とその毒性の変化にある。X線結晶構造解析をベースとして明らかにしたアンチトリプシンの凝集体構造は、構造解析が可能な安定な形の一つに過ぎず、実は巧みに成長・変化を行い、それは細胞内シャペロンタンパク質に対する結合能力の変化として捉えることができる。今後も、アンチトリプシン凝集体形成の全体図を捉えると同時に、毒性の高いfractionの抽出と分析を行い、基礎から応用へ架け橋となる研究を展開したい。

(文責：山崎 特定准教授(白眉)(兼任 白眉センター))

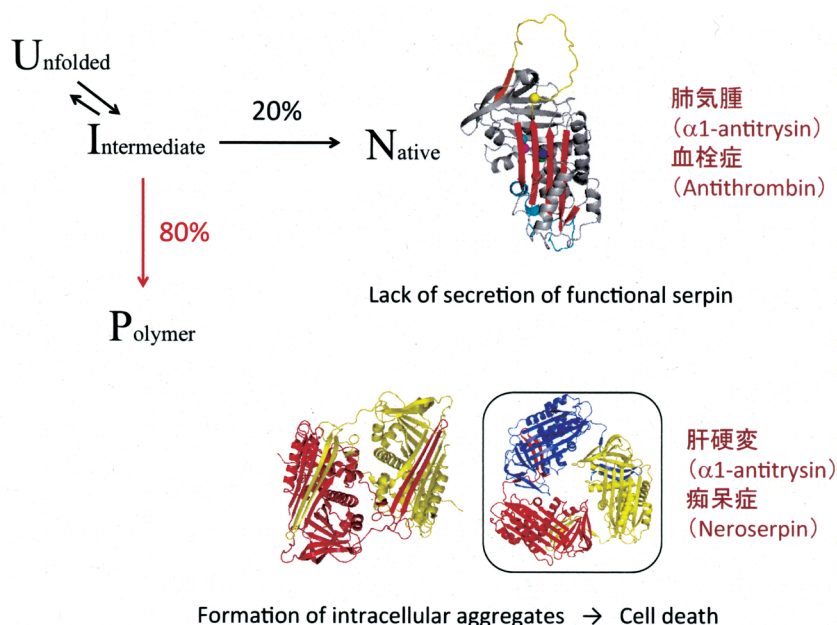


図2 アンチトリプシン欠損症における構造基盤：その凝集の多様性と疾患

Caucasian の 3000 人に 1 人はアンチトリプシン遺伝子に Z/Z 型の家族性変異を持つ。その場合、翻訳されたアンチトリプシンの約 80% は凝集し肝臓に蓄積し、稀に肝硬変を引き起こす。また天然構造への折りたたみに成功するのは残りの約 20% であり、好中球により分泌されるエラスターゼを十分に阻害できず、肺気腫を引き起こす。凝集体構造の形成にはそのメカニズム、形状(線状・環状)など様々な多様性があるが、そのうちの 1 つ(上記四角で囲んだもの)が肝硬変の患者の封入体に多く含まれているようである。

Figure 2 Structural basis for α_1 -antitrypsin deficiency: the diversity of aggregate structures and their relation to disease
1 in 3000 Caucasian has Z/Z type α_1 -Antitrypsin gene mutation. 80% of α_1 -antitrypsin translated forms aggregates in hepatocyte, rarely leading to liver damage and cirrhosis. The rest 20% of α_1 -antitrypsin can be secreted, and however is not enough to inhibit neutrophil elasetase, which is expressed extensively on inflammation, leading to lung damage and emphysema. The way of polymerization can be very diverse on mechanism or morphology. Notably, one of them seems to be incorporated well in the intracellular inclusion of α_1 -antitrypsin deficiency patients.

3. 基本転写機構の解析と RNA aptamer の応用に関する研究

特定の遺伝子で、クロマチンリモデリング関連因子が転写複合体の中に取り込まれ、転写制御に重要な働きを示すこと、また、その機能を発現するためには、基本転写因子とのコミュニケーションが重要であることを、RNA アプタマーを用いた解析であきらかにしてきた。しかし、特定の遺伝子のみで機能することに関しての意味が不明であり、転写活性そのものをあげるのか、あるいは転写伸長過程への移行に影響を与えるかを解析中である。

抗体の取得が困難である分子に対する RNA アプタマーの有用性を証明するため、コラーゲン分子に対するアプタマー分子の取得を試みている。SELEX サイクルに依存して、結合力の上昇した分子が得られていることを示した。今後各アプタマー分子の特徴を解析し、有効な抗原性を提示できない分子に対しても、アプタマー取得が可能であることを証明する。

(文責：平芳)

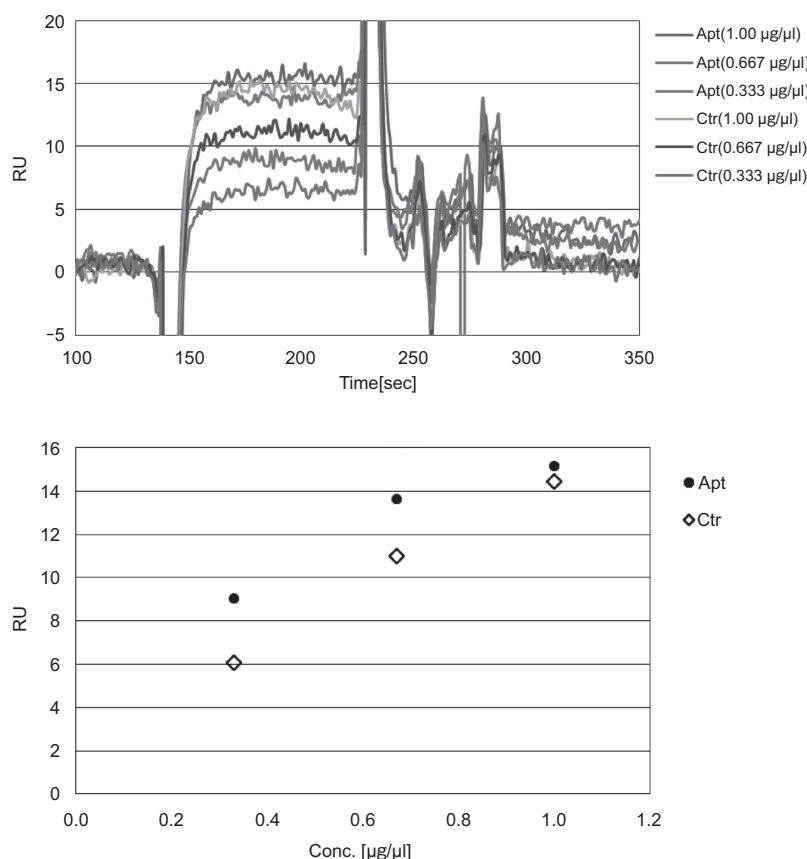


図3 RNA アプタマーのコラーゲン結合活性
SPR により結合を解析した。
上図は結合のプロファイルを示した。
下図は結合量を示す。

Figure 3 Binding activity of RNA aptamer against collagen.
Activity was analyzed by SPR.
Upper figure shows bound profile.
Lower figure shows bound amount.

4. 正常配列とは異なり稀にしか存在しない配列を選択的に増幅できる方法を開発した

正常マウス胸腺で、TCR β 鎖遺伝子 D2-J2.1 組変えの過程で低い頻度ながら生じる非正統的な構造は、本来 D2 と 3' 23RSS の間でおこるべき切断が 5' 12RSS と D2 の間でおこったことが原因であった。このとき、例外的な切断後にそのまま再びつながる“cut-and-shut”も生じるのではないかと考えた。そこでこのケースのように、多数存在する正常配列とは一部のみが異なる稀な配列だけを PCR で増幅できる DRAW (detection of rare constructs using Archaea polymerase without 5'→3' exonuclease activity) 法を開発した(図)。DRAW 法では、TaqMan プロンプ使用のリアルタイム PCR のシステムで、5'→3'エクソヌクレアーゼ活性を欠いた Archaea 由来の DNA ポリメラーゼを用いる。そのために、TaqMan プロンプがアニールできない断片が選択的に増幅される。

現在この方法を用い、正常胸腺においてどの程度 5' 12RSS と D2 の間で“cut-and-shut”ができているのかを調べ

ている。さらに、別の TCR β 鎖遺伝子セグメントと RSS の間でも“cut-and-shut”が生じるのかについても解析中である。(文責：藤本)

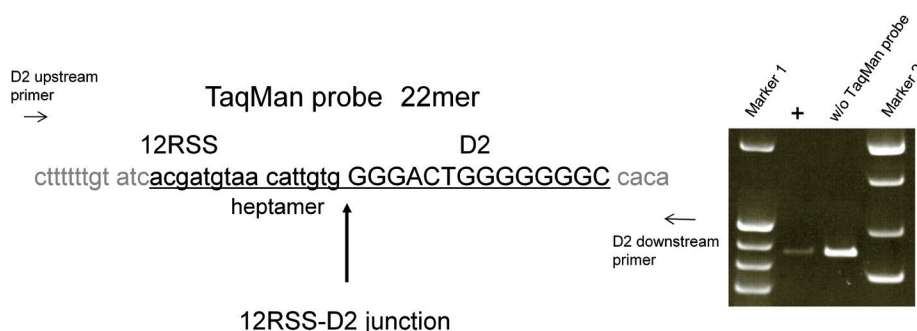


図4 DRAW法で増幅される断片

増幅された配列は、TaqMan プローブがカバーする 5' 12RSS-D2 領域に“cut-and-shut”により変異が導入されていると考えられる。

Figure 4 A DNA fragment obtained by DRAW method

With our TaqMan probe covering 5' 12RSS-D2 junction and Archaea polymerase, a DNA fragment probably originated by “cut-and-shut” is amplifiable.

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

1. Protein quality control mechanism : How proteins are folded and degraded in the endoplasmic reticulum?

The major focus in the Department of Molecular and Cellular Biology is to study the 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). Terminally misfolded polypeptides in the ER are degraded by the cytoplasmic proteasomes after retrotranslocation 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 *N*-glycans by the lectins.

Nascent polypeptides synthesized in the ER acquire their native conformations by the assistance of chaperone proteins and folding enzymes (Fig. 1). However, protein misfolding is evoked under adverse circumstances called ER stress conditions. These aberrant conformers are prone to aggregate, which impair normal cellular functions. Chaperone proteins inhibit such an aggregation formation, and furthermore, assist the refolding of the misfolded proteins. BiP is a major ER chaperone, and we recently have found that ERdj3, a co-chaperone of BiP, forms a complex with SDF2 and SDF2L1. We propose that ERdj3-SDF2/L1 complex functions to inhibit the aggregation formation of misfolded proteins under ER stress, as well as to transfer the nascent polypeptides to BiP for folding (Fig. 1). (by N. Hosokawa)

2. Formation of α_1 -antitrypsin polymer structures and their toxicity

α_1 -Antitrypsin is one of the typical serine protease inhibitors in human and circulates in blood with a changing conc. of 1~3.5 g/L on inflammation. It inhibits neutrophil elastase that can attack the invaders as well as our lung tissue. In Caucasians, not a little people carry a familial mutation in α_1 -antitrypsin gene (1 in 3000 for homozygote Z/Z), and thus the protein forms aggregates in hepatocyte. This leads directly to liver diseases, and indirectly to lung diseases due to the lack of α_1 -antitrypsin secretion in blood, referred as to α_1 -antitrypsin deficiency. This deficiency is based on protein misfolding and aggregation, and is in general recognized as one of the protein aggregation related diseases such as Alzheimer's, Huntington's, and Parkinson's diseases. My research focuses on the molecular mechanism of these protein aggregations to prevent or rescue diseases, especially on α_1 -antitrypsin deficiency.

We first examined how α_1 -antitrypsin can polymerize *in vitro* on the basis of X-ray crystallographic techniques. Interestingly, α_1 -antitrypsin can polymerize via at least 3 distinct mechanisms. Each polymer completes their structure by swapping different structural motifs and the structures seem very similar to the native α_1 -antitrypsin structure. The lack of structural abnormality may explain why antitrypsin aggregates are able to escape from ER-associated degradation system and stably accumulate in cells. Importantly, one of the polymers was preferentially accumulated in the liver inclusions from the Z- α_1 -antitrypsin patient, which was confirmed by a monoclonal antibody sensitive to the polymer form. The Z- α_1 -antitrypsin polymer can also accumulate in mammalian and yeast cells, supporting the idea for specific accumulation of polymer. Based on our crystal structure, the drug has been designed that can reduce the intracellular Z- α_1 -antitrypsin polymer accumulation. It will be interesting to see how it works *in vivo*.

My recent interest has been on the growth of aggregates and their change in toxicity. As X-ray crystallographic approach can be conducted for stable protein species, our crystal structure would be the one snapshot for the diverse α_1 -antitrypsin aggregate structures. Actually, α_1 -antitrypsin aggregate structures can grow and change their morphology time-dependently. Further studies are necessary to describe the whole snapshots of α_1 -antitrypsin aggregate structures. It is also of great importance to fraction the very toxic aggregates and analyze it to set up the strategy for prevention and treatment of α_1 -antitrypsin deficiency. (by M. Yamasaki)

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

We showed that chromatin remodeling related factor was incorporated into the transcription complex and had an important role for the regulation of transcription at specific gene by communicated with general transcription factors. These results were coming from analyses with RNA aptamers. We continue the study to clarify the exact function of chromatin related factor in the transcription complex.

To figure out the effectiveness of RNA aptamer against proteins with weak antigenicity, we continue the selection of RNA aptamers against collagen peptides. Binding avidity was increasing depending on the progress of the SELEX. Thorough analysis of obtained aptamers will show the potency of aptamer against weak antigenic molecule. (by K. Hirayoshi)

4. New method for selectively amplifying rare and partially modified sequences

Unusual cutting in murine normal thymocytes between 5' 12RSS and D2, instead of between D2 and 3' 23RSS,

during *Tcrb* D2 and J2.1 recombination process produces infrequent, illegitimate constructs. It is highly expected that this cutting also generates "cut-and-shut" constructs. In order to detect these seldom occurring events, we established DRAW (detection of rare constructs using Archaea polymerase without 5'→3' exonuclease activity) method (Figure). Using Archaea-derived DNA polymerase, which lacks 5'→3' exonuclease activity, in a real time PCR system enabled us to specifically amplify sequences that the TaqMan probe could not anneal.

We are examining the frequency of "cut-and-shut" occurrence between 5' 12RSS and D2 in normal thymocytes. Also search for other "cut-and-shut" constructs between RSS and *Tcrb* gene segment is under way. (by S. Fujimoto)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 総説・著書

Hosokawa N, Suzuki T : *N*-glycans and Quality Control of Proteins. *Sugar Chains* (Eds. Taniguchi T, Suzuki T, Ohtsubo K) Springer, in press(2015)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

細川暢子, 藤森 力 : 新規小胞体シャペロンタンパク質の機能解析. 第 66 回日本細胞生物学会大会 (2014.6.1. 奈良市) (口頭発表)

Koide T, Ishii A, Hosokawa N, Nishi A (小出 剛, 石井亜矢子, 細川暢子, 西 明紀) : Molecular and genetic analyses of a QTL for increased home-cage activity exclude *Edem1* from the candidate genes (高自発活動マウスの分子遺伝学的解析により *Edem1* は候補遺伝子より除外される). 第 37 回日本神経科学大会 (2014.9.11-13. 横浜市) (ポスター発表)

細川暢子 : 小胞体関連分解を担うユビキチンリガーゼ複合体の機能解析. ウイルス研究所・再生医科学研究所合同学術講演会 (2014.12.22. 京都市) (ポスター発表)

Masayuki Yamasaki, Rina Kodera, Hitomi Shimizu, Nobuyuki Takahashi : Storage of hen-egg induces D-Serine generations at specific sites in egg-white protein, ovalbumin, modulating its properties for food- processing and allergy. The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (2014.9.2-5 Utsunomiya)

山崎正幸, 小寺里奈, 清水 瞳 : アンチトリプシン凝集体の構造平衡とその毒性評価 第 87 回日本生化学会大会 (2014.10.15-18. 京都)

山崎正幸, 小寺里奈, 清水 瞳 : タンパク質の凝集と食品アレルギー 第 5 回生命機能研究会 (2013.11.23. 神戸)

山崎正幸 : アンチトリプシン異常凝集体の多様性とその疾患への関わり タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関わる研究会 (2014.12.11-12. 熊取)

山崎正幸 : アンチトリプシンの不安定な凝集体構造とその毒性 京都大学再生研学術講演会 (2014.12.22. 京都)

法邑賢一・平芳一法 : RNA aptamer による転写複合体中因子の機能解析, (2014.11.25-27. 横浜)

藤本真慈, 柿沼志津子, 島田義也 : TCRβ 鎖遺伝子 V to DJ 再構成の asynchronous allelic initiation は必ずしも常に成立しない. Kyoto T Cell Conference 第 24 回学術集会 (2014.5.16-17. 京都)

藤本真慈, 柿沼志津子, 島田義也: 成熟 $\alpha\beta$ T 細胞でしばしば *Tcrb* 遺伝子 D2-J2 再構成がおこっていないことの原因. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014.11.25-26. 横浜)

FUJIMOTO Shinji, KAKINUMA Shizuko: Atypical 12/23 cases for *Tcrb* D2 to J2 rearrangement. 第 43 回日本免疫学会学術集会 (2014.12.10-12. 京都)

KAWATA Takahito, MASUDA Kyoko, FUJIMOTO Shinji, KAWAMOTO Hiroshi: Segregation of $\gamma\delta$ T cell progenitors prior to TCR β chain gene rearrangement independently of TCR-mediated signal. 第 43 回日本免疫学会学術集会 (2014.12.10-12. 京都)

2) 講演・シンポジウムなど

細川暢子: 細胞の中でタンパク質が作られるーからだを支える細胞の仕組みー. 京都大学再生医科学研究所 第 9 回公開講演会 (2014.7.19. 京都市)

Masayuki Yamasaki: Serpin polymerizations - their structural diversity and toxicity. The 3rd International Conference of Indonesian Chemical Society (ICICS) 2014 (2014.9.16-17. Ambon, Indonesia)

山崎正幸: タンパク質凝集に関する研究と Cambridge での生活 Shiga Science Project 2014 (2014.11.15. 大津)

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 (Regulatory T cells, Treg と略) 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。また Treg を標的として、その数減少、抑制能減弱により癌免疫、感染免疫の惹起・亢進を図り、その数増大、抑制能強化により移植臓器に対する免疫寛容の誘導が可能である。

本年度、Treg によって抑制された自己反応性 T 細胞の、細胞運命、免疫学的特性を解析した。Treg 抑制下で試験管内抗原刺激を行うと、T 細胞抗原レセプター (TCR) の抗原親和性に依存して、低親和性 CD8⁺ T 細胞は、1 回の細胞分裂の後、分裂を停止し、TCR 刺激を与えても IL-2 などのサイトカインを産生しなくなり、二次刺激にも強固な不応答を示す。このアナジー (anergy) の誘導は、Treg による抗原提示細胞上 CD80, CD86 の発現抑制によるものである。興味深いことに、このようなアナジー T 細胞は、表現型として CCR7 を発現するナイーブ T 細胞でありながら CTLA-4 を高発現する特徴をもつ。実際、健康人末梢血中の自己抗原特異的 CD8⁺ T 細胞をペプチド・MHC テトラマーを用いて分離すると、それらは CCR7⁺CTLA-4⁺で、機能的にアナジー T 細胞であった。これらの結果は、Treg に抑制された自己反応性 T 細胞をアンジー状態にすることで安定な免疫自己寛容が導入維持されること、さらに、健康人の免疫系には、そのようなアナジー T 細胞が存在することを証明したものである (Maeda et al., Science 2014)。この知見は、免疫自己寛容、自己免疫病の理解に重要である。

(2) 自己免疫、腫瘍免疫、移植免疫の基礎的研究

当研究室では、ヒトの FoxP3⁺Treg を機能的サブセットに分け、特定のサブセットを標的とすることで、ヒトの病的、生理的免疫応答の制御を目指している。本年度、現在ヒト T 細胞に反応するとされる約 300 種類のモノクローナル抗体について Treg との反応性を検討したところ、CD15s (Sialyl Lewis X) が、最終的に分化し、最も抑制活性の高い制御性 T 細胞サブセット (effector Treg, eTreg と略) に特異的に発現していることを見出した。さらに、CD15s の発現を指標にして、Foxp3⁺T 細胞の中に含まれる非抑制性 T 細胞と Foxp3⁺抑制性 T 細胞を弁別できることを示した。即ち、CD15s によって抑制性 Treg を高度に純化できることを示した。実際、健康人末梢血から CD15s⁺CD4⁺ T 細胞を除去し自己抗原で刺激すると、試験管内での自己反応性 T 細胞の活性化・増殖を誘導できた。同様に、腫瘍抗原で刺激すれば腫瘍抗原特異的 T 細胞の増殖を惹起できた (Miyara et al., PNAS, in press)。この結果は、CD15s 発現制御性 T 細胞を標的としてヒトの免疫応答を制御できる可能性を意味する。

(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

当研究室で確立した 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、この実験系を用いて、関節炎惹起性 T細胞の認識する自己抗原を解析した。関節炎症部位より採取した T細胞の TCR 遺伝子を RAG-/-マウス骨髓細胞に発現させ retrogenic mice を作製し関節炎の発症をみることで、関節炎惹起能を有する TCR を複数同定した。次に、retrogenic mouse に B細胞を再構築し、関節炎惹起性 T細胞のヘルプにより産生される自己抗体が認識する自己抗原を同定したところ、そのひとつは 60S ribosomal protein L23a(RPL23A)であった。実際、関節リウマチ患者の血中に抗 RPL23A 抗体を証明でき、患者関節液中 T細胞の一部はこの抗原を認識して炎症性サイトカインを産生した。以上の結果の新規性は、T細胞性自己免疫疾患、特に全身性自己免疫病で、全身性に発現し、正常免疫系では自己反応性 T細胞の除去(negative selection)に働く自己抗原の同定法を開発したことにある。これを用いて他の全身性自己免疫疾患の病態解明につなげたい(Ito et al., Science, 2014)。

This department studies: (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance, in particular the roles of regulatory T cells; (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 systemic autoimmune diseases, such as 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⁺ T cells (Tregs). Yet how Treg cells effectively control potentially hazardous self-reactive T cells in humans remains an open question. In particular, it is unknown whether Treg-cell-mediated suppression for a limited period has a critical long-lasting effect on cell fate and antigen reactivity of autoimmune T cells. This year, by addressing this issue, we have shown that Treg cells can render self-reactive human CD8⁺ T cells anergic (i.e., hypo-proliferative and cytokine hypo-producing upon antigen re-stimulation) in vitro, likely by controlling the co-stimulatory function of antigen-presenting cells. Anergic T cells were naïve in phenotype, lower than activated T cells in T-cell receptor affinity for cognate antigen, and expressed several co-inhibitory molecules, including cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4). Using these criteria, we detected in healthy individuals anergic T cells reactive with a skin antigen targeted in the autoimmune disease vitiligo. Collectively, our results suggest that Treg-cell-mediated induction of anergy in autoimmune T cells is important for maintaining self-tolerance, and can be a key target in controlling autoimmunity and tumor immunity.

This laboratory has been studying Treg cells in humans. FOXP3⁺CD25⁺CD4⁺T cells in humans are, however, heterogeneous in function and differentiation status, including suppressive or non-suppressive cells as well as resting or activated Treg cells. We have searched for cell surface markers specific for suppression-competent Treg cells by using a panel of currently available monoclonal antibodies reactive with human T cells. We found that CD15s (sialyl Lewis x) was highly specific for activated, terminally differentiated and most suppressive FOXP3^{high} effector Treg (eTreg) cells and able to differentiate them in various clinical settings from non-suppressive FOXP3⁺T cells secreting inflammatory cytokines. For example, CD15s⁺FOXP3⁺ eTreg cells were increased in sarcoidosis while it was non-suppressive CD15s⁻FOXP3⁺T cells that were expanded in lupus flares. FOXP3⁺ cells induced from conventional CD4⁺T cells by TCR stimulation hardly expressed CD15s. CD15s⁺CD4⁺T cell depletion was sufficient

to evoke and enhance *in vitro* immune responses against tumor or viral antigens. Collectively, we have identified CD15s as a biomarker instrumental in both phenotypic and functional analysis of FOXP3⁺CD4⁺T cell subpopulations in health and disease. It allows specific targeting of eTreg cells, rather than whole FOXP3⁺CD4⁺T cells, in controlling immune responses.

This laboratory previously established an animal mode of autoimmune arthritis, called SKG mice, which possess a ZAP-70 gene mutation and spontaneously develop T cell-mediated autoimmune arthritis immunopathologically similar to rheumatoid arthritis (RA) in humans. T cells mediating autoimmune diseases, such as RA, are technically difficult to characterize because they are likely to be deleted or inactivated in the thymus if the self-antigens they recognize are ubiquitously expressed. This can be circumvented by altering TCR signaling, which changes the sensitivity of developing T cells to thymic selection and results in new dominant self-reactive TCR specificities that are causative of systemic autoimmune diseases. With this strategy, we have isolated arthritogenic TCRs from SKG mice and characterized the self-antigens they recognized. One of them was the ubiquitously expressed 60S ribosomal protein L23a (RPL23A), with which T cells and autoantibodies from RA patients reacted. Our approach is instrumental in deciphering how T-cell autoimmunity to a ubiquitous self-antigen should trigger localized tissue damage in RA and other human autoimmune diseases, and devising effective ways of their systemic or local intervention.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Maeda Y, Nishikawa H, Sugiyama D, Ha D, Hamaguchi M, Saito T, Nishioka M, Wing JB, Adeegbe D, Katayama I, Sakaguchi S. Detection of self-reactive CD8⁺ T cells with an anergic phenotype in healthy individuals. *Science*. 346 : 1536-1540, 2014.
- Ito Y, Hashimoto M, Hirota K, Ohkura N, Morikawa H, Nishikawa H, Tanaka A, Furu M, Ito H, Fujii T, Nomura T, Yamazaki S, Morita A, Vignali DA, Kappler JW, Matsuda S, Mimori T, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Detection of T-cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. *Science*. 346 : 363-368, 2014.
- Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T-cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity*. 41 : 1013-1025, 2014.
- Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T, and Baba Y. Interleukin-10- Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity*. 41 : 1040-1051, 2014.
- Vahl JC, Drees C, Heger K, Heink S, Fischer JC, Nedjic J, Ohkura N, Morikawa H, Poeck H, Schallenberg S, Rieß D, Hein MY, Buch T, Polic B, Schönte A, Zeiser R, Schmitt-Gräff A, Kretschmer K, Klein L, Korn T, Sakaguchi S, Schmidt-Supprian M. Continuous T Cell Receptor Signals Maintain a Functional Regulatory T Cell Pool. *Immunity*. 41 : 722-736, 2014.
- Yamazaki S, Nishioka A, Kasuya S, Ohkura N, Hemmi H, Kaisho T, Taguchi O, Sakaguchi S, Morita A. Homeostasis

- of Thymus-Derived Foxp3⁺ Regulatory T Cells Is Controlled by Ultraviolet B Exposure in the Skin. *J Immunol.* 193 : 5488-5497, 2014.
- Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S. Epigenetic control of thymic Treg-cell development. *Eur. J. Immunol.* 2014 Oct 28.
- Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, Bulashevskaya A, Petersen BS, Schäffer AA, Grüning BA, Unger S, Frede N, Baumann U, Witte T, Schmidt RE, Dueckers G, Niehues T, Seneviratne S, Kanariou M, Speckmann C, Ehl S, Rensing-Ehl A, Warnatz K, Rakhmanov M, Thimme R, Hasselblatt P, Emmerich F, Cathomen T, Backofen R, Fisch P, Seidl M, May A, Schmitt-Graeff A, Ikemizu S, Salzer U, Franke A, Sakaguchi S, Walker LS, Sansom DM, Grimbacher B. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med.* 20 : 1410-1416, 2014.
- Sakaguchi S, Sallusto F, Gebhardt T, Stingl G, Clark RA, Santamaria-Babi LF, Guttman-Yassky E, Schuler G, Koenen HJ. FRT - Fondation Rene Touraine : Pour La Dermatologie. *Exp Dermatol.* 23 : 772-785, 2014.
- Morikawa H, Ohkura N, Vandenbon A, Itoh M, Nago-Sato S, Kawaji H, Lassmann T, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest A, Standley D, Date D, Sakaguchi S, and the FANTOM consortium. Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *PNAS.* 111 : 5289-5294, 2014.
- Pastille E, Bardini K, Fleissner D, Adamczyk A, Frede A, Wadwa M, von Smolinski D, Kasper S, Sparwasser T, Gruber AD, Schuler M, Sakaguchi S, Roers A, Müller W, Hansen W, Buer J, Westendorf AM. Transient Ablation of Regulatory T cells Improves Antitumor Immunity in Colitis-Associated Colon Cancer. *Cancer Res.* 74 : 4258-4269, 2014.
- Morishima A, Hirano T, Nishikawa H, Nakai K, Sakaguchi S, Kumanogoh A. Comprehensive exploration of autoantibody in Behçet's disease : A novel autoantibody to claudin-1, an essential protein for tight junctions, is identified. *Joint Bone Spine.* 81 : 546-548, 2014.
- Mikami N, Sakaguchi S. CD28 signals the differential control of regulatory T cells and effector T cells. *Eur J Immunol.* 44 : 955-957, 2014.
- Miyara M, Ito Y, Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 10 : 543-551 2014.
- Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function : From a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol. Rev.* 259 : 192-205, 2014.
- Forrest A, ..., Morikawa H., ..., Hamaguchi M., ..., Ohkura N., ..., Sakaguchi S, ..., Hayashizaki Y, et al., A promoter level mammalian expression atlas. *Nature.* 507 : 462-470, 2014.
- Wing JB, Sakaguchi S. Foxp3⁺ Treg cells in humoral Immunity. *Int Immunol.* 26 : 61-69, 2014.
- Fujii H, Arakawa A, Utsumi D, Sumiyoshi S, Yamamoto Y, Kitoh A, Ono M, Matsumura Y, Kato M, Konishi K, Shiga T, Sano S, Sakaguchi S, Miyagawa-Hayashino A, Takahashi K, Uezato H, Miyachi Y, Tanioka M. CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes at primary sites as a possible prognostic factor of cutaneous angiosarcoma. *Int J Cancer.* 134 : 2393-2402, 2014.
- Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 27 : 1-7, 2014.

◆ 学会等の講演 ◆

1) 学会・研究会発表

Yoshinaga Ito, Motomu Hashimoto, Takashi Nomura, Noriko Sakaguchi and Shimon Sakaguchi: Cloning of an arthritogenic TCR from CD4⁺T cells in spontaneous autoimmune arthritis. KEYSTONE SYMPOSIA Inflammatory Diseases: Recent Advances in Basic and Translational Research and Therapeutic Treatments (2014.1.17-22. Vancouver, Canada)

Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Keiji Hirota, Ichiro Taniuchi, Motonari Kondo, Terumi Kohwi-Shigematsu and Shimon Sakaguchi: Divergent roles of the genome organizer Satb1 in the development of thymic and peripheral regulatory T cells. KEYSTONE SYMPOSIA Inflammatory Diseases: Recent Advances in Basic and Translational Research and Therapeutic Treatments (2014.1.17-22. Vancouver, Canada)

Motono Osaki and Shimon Sakaguchi: The soluble form of CTLA-4 in regulatory T cells-mediated suppression. KEYSTONE SYMPOSIA Inflammatory Diseases: Recent Advances in Basic and Translational Research and Therapeutic Treatments (2014.1.17-22. Vancouver, Canada)

北川瑠子, 大倉永也, 廣田圭司, 安田佳子, 谷内一郎, 近藤元就, 重松照美, 坂口志文: 胸腺と末梢の制御性 T 細胞発生における SATB1 の役割 第 24 回 Kyoto T Cell Conference (2014.5.16-17. 京都)

木本富子 Tim-3 は高度に分化, 活性化した IL-10 産生 Treg のマーカーである 第 24 回 Kyoto T Cell Conference (2014.5.16-17. 京都)

Yohko Kitagawa: The genome organizer Satb1 differentially controls thymic and peripheral development of regulatory T cells. The Fourth International Conference on Regulatory T Cells and T Helper Cell Subsets and Clinical Application in Human Diseases (2014.11.1-4. Shanghai, China)

James Wing: Regulatory T-cells control antigen-specific Tfh expansion and humoral immune responses via CTIA-4. The Fourth International Conference on Regulatory T Cells and T Helper Cell Subsets and Clinical Application in Human Diseases (2014.11.1-4. Shanghai, China)

Osaki Motono, Sakaguchi Shimon: The soluble form of CTLA-4 in regulatory T cells-mediated suppression 第 43 回日本免疫学会総会・学術総会 (2014.12.10-12. 京都)

Kitagawa Yohko, Ohkura Naganari, Hirota Keiji, Adeegbe Olakunle, Yasada Keiko, Kondo Motonari, Taniuchi Ichiro, Kohwi-Shigematsu Terumi, Sakaguchi Shimon: The genome organizer Satb1 differentially controls thymic and peripheral development of regulatory T cells. 第 43 回日本免疫学会総会・学術総会 (2014.12.10-12. 京都)

Wing James Badger, Ise Wataru, Kurosaki Tomohiro, Sakaguchi Shimon: Regulatory T-cells control antigen-specific Tfh expansion and humoral immune responses via CTIA-4. 第 43 回日本免疫学会総会・学術総会 (2014.12.10-12. 京都)

Yamazaki Sayuri, Nishioka Akiko, Kasuya Saori, Ohkura Naganari, Hemmi Hiroaki, Kaisho Tuneyasu, Taguchi Osamu, Sakaguchi Shimon, Morita Akimichi: Homeostasis of thymus-derived Foxp3⁺ regulatory T cells is controlled by ultraviolet B exposure in the skin. 第 43 回日本免疫学会総会・学術総会 (2014.12.10-12. 京都)

2) 講演・シンポジウム

Shimon Sakaguchi: Roles of Treg Cells in Inflammation. KEYSTONE SYMPOSIA Inflammatory Diseases: Recent Advances in Basic and Translational Research and Therapeutic Treatments(2014.1.17-22. Vancouver, Canada)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. 2014 Senri Life Science International Symposium "Innate Immunity, Cytokines, and Immune Regulation" (2014.1.31. Osaka)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御: 自己免疫と腫瘍免疫の共通基盤について 岡山大学大学院医歯薬総合研究科特別講演会(2014.2.13. 岡山)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 8 回京阪神バイオメディクス研究会(2014.3.7. 大阪)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. 10th Spring School on Immunology (2014.3.9-14. Ettal, Germany)

Shimon Sakaguchi: Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function. 2014 Beijing-Shanghai Immunology Joint Symposium (2014.4.12. Hangzhou, China)

Shimon Sakaguchi: Epigenetic changes and Treg cell development. European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress 2014 (2014.6.7-11. Copenhagen, Denmark)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in autoimmunity and tumor immunity. The 1st joint symposium of Karolinska Institute and Osaka University 2014 Immunology and Infection biology (2014.6.10 Stockholm, Sweden)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 38 回日本リンパ学会総会(2014.6.21. 東京)

Shimon Sakaguchi: Control of autoimmunity and tumor immunity by regulatory T cells. RJKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology 2014 Decoding Immune Complexity – Bench to Bedside – (2014.6.26-27. 横浜)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 51 回日本消化器免疫学会総会(2014.7.10-11. 京都)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 – 特に自己免疫と主要免疫について 第 13 回北野病院医学研究所研究発表会(2014.7.19. 大阪)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 33 回分子病理学研究会(2014.7.25-26. 蔵王)

坂口志文: 制御性 T 細胞の発生と機能 第 16 回免疫サマースクール 2014 in 小豆島(2014.7.28-31. 小豆島)

Shimon Sakaguchi: Control of Tumor Immunity by Regulatory T Cells. IAAO(International Academy for Advanced Oncology)Convergence for Breakthroughs in Oncology Therapy(2014.8.1-2. 東京)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 51 回補体シンポジウム(2014.8.22-23. 神戸)

坂口志文: 制御性 T 細胞の発見と機能 基礎から臨床への展開 北海道大学医学部 免疫学・炎症学アドバンストセミナー(2014.8.25. 札幌)

Shimon Sakaguchi: Control of Treg cells for immune tolerance. Novo Nordisk innovation summit Tokyo(2014.10.1-2. 東京)

坂口志文: 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 87 回日本生化学会大会(2014.10.15-18. 京都)

Shimon Sakaguchi: Treg-mediated control of the cell fate of autoimmune T cells The Fourth International Conference on Regulatory T Cells and T Helper Cell Subsets and Clinical Application in Human Diseases (2014.11.1-4. Shanghai, China)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T Cells : Development, Maintenance and Function in Normal and Disease States
The 2014 Fall Conference of Korean Association of Immunologists (2014.11.6-7. Seoul, Korea)

Shimon Sakaguchi : Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function. Academy of Immunology
and Microbiology Workshop on Immunology 2014 (2014.11.9-10. Pohan, Korea)

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. BK seminar Integrative Biosciences and
Biotechnology (2014.11.10. Pohan, Korea)

坂口志文 : 制御性 T 細胞と自己免疫・癌 第 57 回日本甲状腺学会学術集会 (2014.11.13-15. 大阪)

Shimon Sakaguchi : Keynote Address Immune Regulation for Cancer Immunotherapy The 45th International Sym-
posium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund : Recent Advances in Cancer Immunotherapy
(2014.11.18-20, 東京)

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. Distinguished Lecture (2014.12.3, Marburg
Germany)

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells : development, maintenance and function in normal and disease states 22nd
FRT – Fondation Rene Touraine Annual Scientific Meeting (2014.12.5. Paris, France)

坂口志文 : Control of autoimmunity and tumor immunity by regulatory T cells. 日本研究皮膚科学会第 39 回年次
学術大会・総会 (2014.12.14. 大阪)

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と接着することを報告した(Kiel, MJ. 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, MJ. et al., *Nature* 449, 238-242(2007))、Nカドヘリン欠損マウスの造血幹細胞数は正常であり、骨芽細胞の造血幹細胞ニッチとしての機能が証明されるには至っていない。

私たちは、これまでに、遺伝子欠損マウスを用いた解析によりケモカイン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免疫担当細胞)、NK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); Noda, M. et al., *Blood* 117; 451-458(2011))。さらに、CXCL12の生理的な発現細胞を可視化できる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の大部分がCAR細胞の細胞突起に接着していることを示した(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))。

*

次に、私たちは、CAR細胞の、造血幹細胞・前駆細胞における役割を検討するため、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投与によりCAR細胞の特異的細胞死を誘導することができるマウス(CAR細胞欠損マウス)を作製し解析した。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細胞前駆細胞と赤血球前駆細胞の増殖にも必須であること、造血幹細胞・前駆細胞の維持に必須の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細胞は脂肪・骨芽細胞前駆細胞であることを示した(Omatsu, Y. et al., *Immunity* 33, 387-399(2010))。

*

2012年、米国のMorrisonらはSCFを発現する細胞を蛍光蛋白質GFPで可視化できるSCF-GFPノックインマウスを作製し、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を見出した。このSCF高発現細胞はCAR細胞とほぼ同一である。更に、彼らは、レプチン受容体CreノックインマウスとSCF^{lox/lox}マウスを用いた解析より、SCF高発現細胞でSCFを欠損させると造血幹細胞数が著減したことを報告し(Ding, L. et al., *Nature* 481, 457-462(2012))、米国のLinkらは、私たちとの共同研究で、骨髄の血管内皮細胞を除く非血球細胞でCXCL12を欠損するマウスでは造血幹細胞数が著減することを示した(Greenbaum, A. et al., *Nature* 495, 227-230(2013))。以上より、CAR細胞は、CXCL12とSCFを産生し、造血幹細胞・前駆細胞の維持に必須のニッチを形成することが確認された。

*

しかし、脂肪細胞・骨芽細胞前駆細胞は筋肉を含め、多くの組織に存在することが報告されている。そこで、私たちは、骨髄の脂肪細胞・骨芽細胞前駆細胞のみが造血幹細胞・前駆細胞ニッチを形成する分子基盤を明らかにするため、骨芽細胞との比較により、CAR細胞特異的に発現する遺伝子を検索した。その結果、フォークヘッドファミリーに属する転写因子で先天性水頭症の原因遺伝子として知られていたFoxc1がCAR細胞特異的に発現することを見出した。そこで、CAR細胞特異的遺伝子欠損マウスと成体で遺伝子欠損を誘導するマウス、脂肪細胞前駆細胞株を用いた解析を行い、Foxc1は、CAR細胞において造血幹細胞と免疫担当細胞の前駆細胞の細胞数を維持するニッチの形成と維持、脂肪細胞への分化の抑制による未分化性維持に必須であることを明らかにした(Omatsu, Y. et al., *Nature* 508, 536-540(2014))。この発見によって、脊椎動物ではじめて多能性幹細胞・前駆細胞を維持するニッチの形成と成体での維持の分子機構が明らかになった。

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 (Tokoyoda, K. et al., *Immunity* 20, 707-718 (2004), Sugiyama, T. et al., *Immunity* 25, 977-988 (2006)). In addition, we generated mice that allowed selective ablation of CAR cells within bone marrow. Short-term ablation of CAR cells in vivo 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 HSCs and lymphoid and erythroid progenitors. Thus, the adipo-osteogenic progenitor

CAR cells is required for production of CXCL12 and SCF, proliferation of HSCs and lymphoid and erythroid progenitors (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.

Recently, we found that the transcription factor Foxc1 was preferentially expressed in CAR cells in the marrow and was essential for development and maintenance of the HSPC niche, enhancing CXCL12 and SCF expression, and inhibiting adipogenic processes in CAR progenitors (Omatsu, Y. et al., *Nature* 508, 536-540 (2014)).

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

(* corresponding author)

Omatsu, Y., Seike, M., Sugiyama, T., Kume, T., *Nagasawa, T.

Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation.

Nature 508(7497); 536-540, 2014.

Vogt, D., Hunt, R., Mandal, S., Sandberg, M., Silberberg, S., Nagasawa, T., Yang, Z., Baraban, S., *Rubenstein, J.

Lhx6 directly regulates Arx and CXCR7 to determine cortical interneuron fate and laminar position.

Neuron 82(2); 350-364, 2014.

Ono, N., Ono, W., Mizoguchi, T., Nagasawa, T., Frenette, P., *Kronenberg, H.

Vasculature-associated cells expressing nestin in developing bones encompass early cells in the osteoblast and endothelial lineage.

Dev. Cell 29(3); 330-339, 2014.

Ono, N., Ono, W., Nagasawa, T., *Kronenberg, H.

A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones.

Nat. Cell Biol. 16(12); 1157-1167, 2014.

2) 英文総説

*Nagasawa, T.

CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4.

J. Mol. Med. 92(5); 433-439, 2014. Review.

3) 和文総説, 著書

長澤丘司 “労を惜しまず一隅を照らす” 若き研究者へ贈る言葉 日本臨床社(2014)

長澤丘司, 尾松芳樹, 杉山立樹 “造血幹細胞を維持する骨髄のニッチ” 実験医学 Vol. 32 No 16; 2543-2550(2014)

長澤丘司 “組織幹細胞のニッチとは” 実験医学 Vol. 32 No 16; 2540-2542(2014)

長澤丘司 “骨髄の造血幹細胞ニッチ” Clinical Calcium Vol. 24 No 4 医薬ジャーナル社; 55-64(2014)

長澤丘司 “造血幹細胞ニッチ” 炎症と免疫 Vol. 22 No 5 医薬ジャーナル社; 22-31(2014)

◆ 学会等の発表 ◆

招待講演(海外または国際学会)

T. Nagasawa 第35回 日本炎症・再生医学会 JSIR-JCO Joint Symposium “The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow”(2014/07/03 万国津梁館 名護 沖縄)

Nagasawa, T., Omatsu, Y., Sugiyama, T. Cold Spring Harbor Conferences Asia; Frontiers of Immunology in Health and Diseases. Invited Speaker. “The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow”(September 4, 2014, Cold Spring Harbor Conferences Asia, Suzhou, China)

Nagasawa, T. Stowers Institute for Medical Research, Wednesday Lectures. Invited Wednesday Lecture speaker. “The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow”(September 17, 2014, Stowers Institute for Medical Research Kansas, USA)

T. Nagasawa The 24th Hot Spring Harbor International Symposium “The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow”(2014/11/07 九州大学 福岡)

T. Nagasawa 第43回日本免疫学会学術集会シンポジウム microenvironments for stem and immune cells. “The microenvironmental niches for hematopoietic stem and progenitor cells in bone marrow”(2014/12/11 国立京都国際会館 京都)

招待講演(国内)

長澤丘司 第14回 日本再生医療学会総会特別講演 “ケモカインと造血幹細胞ニッチ”(2014/03/04 国立京都国際会館 京都)

長澤丘司 関西血管生物研究会 2014 特別講演 “骨髄で造血幹細胞・前駆細胞を維持する微小環境ニッチ”(2014/10/25 ANA クラウンプラザホテル大阪 大阪)

長澤丘司 2014 年度 武田科学振興財団研究助成金・奨励金贈呈 記念講演 “造血幹細胞と血液・免疫細胞の産生を調節する微小環境(ニッチ)の解明”(2014/11/12 シェラトン都ホテル東京 東京)

長澤丘司 基生研セミナー “骨髄で造血幹細胞・前駆細胞を維持する微小環境ニッチ”(2014/11/21 基礎生物学研究所 岡崎 愛知)

長澤丘司 第4回えひめ骨と免疫学セミナー 特別講演 “骨髄で造血幹細胞・前駆細胞を維持する微小環境ニッチ”(2014/11/26 愛媛大学医学部 松山)

学会発表(ポスター発表)

尾松芳樹 第43回日本免疫学会学術集会「造血幹細胞・前駆細胞と免疫細胞を維持するニッチの機能と形成機構の解析」(2014/12/10-12 国立京都国際会館京都)

〈受 賞〉

・ 長澤 丘司

2014 年度 武田医学賞

・ 尾松 芳樹

第 9 回 日本免疫学会研究奨励賞

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・靱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ると共に、細胞の移動速度、定方向性が共に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的な作用機序を介していると考えられた。

(2) 内軟骨性骨形成における ChM-I の活性制御に関する研究

骨格の大部分をつくる長管骨は胎生期にまず軟骨性の骨原基として形成され、発生後期に至って初めて軟骨肥大化・石灰化領域に血管が侵入する。これを契機に軟骨は骨へと置換される(内軟骨性骨形成)。軟骨細胞によって産生される分子量 20-25 kDa の血管新生抑制因子 ChM-I は、軟骨性骨原基のうちでも無血管な領域(静止軟骨・増殖軟骨・前肥大軟骨)の細胞外マトリックスに特異的に局在するが、分化が進み血管侵入を許容する肥大化・石灰化

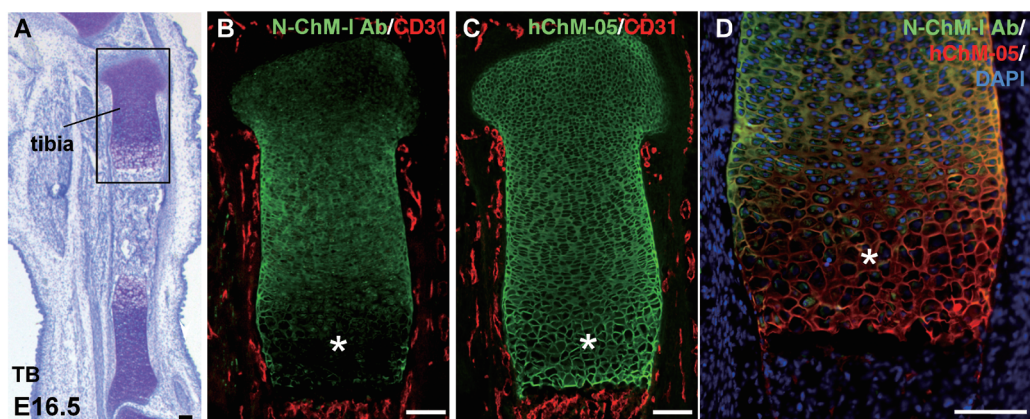
軟骨の細胞外マトリックスには存在しない。本年度は、軟骨組織内に新たに見出した 14-kDa の ChM-I 断片を手掛かりとして、軟骨内骨化過程における ChM-I の分解/不活性化についてその一端を明らかにした。

組換えヒト ChM-I を抗原として新たに作成した ChM-I モノクローン抗体(hCHM-05 抗体)を用いてウェスタンブロット解析を行うと、軟骨抽出物には糖鎖修飾を受けた 20-25 kDa ChM-I の幅広いバンドと共に 14-kDa の免疫交差バンドが検出された。そこで、免疫沈降によりこれを回収・精製し、N 末端配列を解析したところ ChM-I の Asp³⁷-Asp³⁸ が切断されて生じる N 末端 37 残基を欠いた ChM-I フラグメント(14-kDa ΔN-ChM-I)であることが判明した。この diacidic 部位は V8 プロテアーゼで切断できるので、組換え ChM-I から 14-kDa ΔN-ChM-I を調製し、VEGF-A に対する血管内皮細胞の遊走活性を指標にその生物活性を検定したところ、血管新生抑制活性をほぼ失っている事が分かった。さらに、N 末端部分をエピトープとする抗 ChM-I ペプチド抗体(N-ChM-I Ab)と 20-25 kDa ChM-I と 14-kDa ΔN-ChM-I の両方を認識する hCHM-05 モノクローン抗体を用いて骨原基を二重免疫染色したところ、肥大化・石灰化軟骨層には 14-kDa ΔN-ChM-I のみが存在することが明らかとなった(図)。血管新生抑制活性が消失していることが既に知られているが肥大化・石灰化軟骨では、ChM-I が Asp³⁷/Glu³⁷-Asp³⁸ の diacidic 部位で切断されることで軟骨部位特異的に不活性化されていることが示唆された。

2. 軟骨と腱/靱帯の連結部の構築における *Scx*⁺/*Sox9*⁺前駆細胞の役割の解析

脊椎動物が体を動かすためには、骨格・筋・腱の緊密で機能的かつ物理的な連結が不可欠である。腱は筋と骨格を連結することで、メカニカルトランスミッターとして機能し、一方、靱帯は骨と骨を連結することで関節の安定化を担う。軟骨・筋・腱・靱帯などの各コンポーネントは、筋骨格系の発生初期にまず独立した原基として形成される。その後、組織形成の進行に伴って各コンポーネントは連結されるが、そのメカニズムは明らかにされていない。

SRY-box containing gene 9(*Sox9*)と *Scleraxis*(*Scx*)はそれぞれ軟骨形成と腱形成に不可欠な転写因子であるが、



E16.5 マウス軟骨性骨原基における 14-kDa ΔN-ChM-I と 20-25 kDa ChM-I の局在

E16.5 マウス胚の後肢より凍結切片を作製し、軟骨性骨原基における 14-kDa および 20-25 kDa ChM-I 分子種の局在を免疫染色により解析した。(A) 頸骨縦断切片のトルイジンブルー染色像。(B, C) 頸骨近位部(パネル A 囲い領域)の免疫染色像。頸骨縦断切片を血管マーカーである CD31(赤)抗体および N-ChM-I(緑)抗体(B)抗体または hCHM-05 ChM-I MoAb(緑)抗体を用いて免疫二重染色した。(D) 頸骨縦断切片を N-ChM-I(緑)抗体および hCHM-05 ChM-I MoAb(赤)抗体を用いて免疫二重染色した。核染色(青)は DAPI を用いて行った。パネル B-D におけるアステリスク(*)は、肥大化軟骨層を示す。スケールバーは 100 μm を示す。

Differential distribution of 14-kDa ΔN-ChM-I and 20-25 kDa ChM-I in mouse developing bone at E16.5.

Frozen sections were prepared from legs of an E16.5 mouse embryo. (A) Toluidine blue (TB) staining of the sagittal section of tibia and fibula. (B, C) Immunofluorescent views of the boxed area in panel A. Double immunofluorescent staining of the sagittal section of proximal tibia with CD31 (red) and N-ChM-I Ab (green; B) or hCHM-05 ChM-I MoAb (green; C). (D) Double immunofluorescent staining of the sagittal section of proximal tibia with N-ChM-I Ab (green) and hCHM-05 ChM-I MoAb (red). The nuclei were counterstained with DAPI(blue). Asterisks in the panels B-D indicate hypertrophic cartilage zone. Scale bars, 100 μm.

一部の腱・靭帯前駆細胞や軟骨前駆細胞においては、筋骨格系形成初期に *Sox9* と *Scx* が共に発現している。そこで、*ScxCre* マウスとレポーターマウスを交配して *Scx* 陽性細胞の系譜を解析すると、*Scx* 陽性である軟骨前駆細胞が軟骨と腱/靭帯の連結部付近の軟骨細胞に分化することが明らかとなった。

また、*Scx* の発現領域において *Sox9* 陽性細胞の系譜を解析した結果、*Scx* 陽性細胞は *Sox9* の発現履歴により、*Scx*⁺/*Sox9*⁺前駆細胞と *Scx*⁺/*Sox9*⁻前駆細胞の二つの集団に分かれることが明らかとなった。腱細胞は *Scx*⁺/*Sox9*⁺ 及び *Scx*⁺/*Sox9*⁻前駆細胞に由来しており、軟骨原基に近づくほど多くの腱細胞が *Scx*⁺/*Sox9*⁺ に由来していた。靭帯細胞と椎間板の線維輪の細胞は *Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞に由来していた。さらに、*Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞において特異的に *Sox9* を欠失させると、軟骨と腱/靭帯の連結部や椎間板の線維輪において低形成や欠損が認められた。これらの結果から、*Scx*⁺/*Sox9*⁺細胞群は腱細胞・靭帯細胞・軟骨細胞となる多能性を有し、軟骨と腱/靭帯の連結部の構築に寄与することが明らかとなった。

3. Pax1 による軟骨細胞の分化成熟の抑制

Pax1 (Paired box gene 1) は、胚発生過程において硬節で発現し、中軸骨格の形成に重要な役割を担う転写因子である。*Pax1* は *Nk3 homeobox 2* (*Nkx3.2*) の発現を誘導することにより、初期の軟骨細胞分化を促進することが報告されているが、軟骨細胞における *Pax1* の直接的な役割については明らかにされていない。我々は、*Pax1* の強制発現が軟骨細胞の分化成熟を抑制することを見出した。脊柱の形成過程において、椎骨と椎間板は硬節に由来する事が知られている。ニワトリ胚での解析の結果、硬節で認められた *Pax1* の発現は、椎骨の軟骨性骨原基の形成に伴って軟骨では低下して軟骨膜と椎間板に局限した。軟骨細胞のマスター遺伝子である *SRY-box containing gene 9* (*Sox9*) は、軟骨だけでなく椎間板でも発現し、形成過程の脊柱では椎間板において *Pax1* と重複した発現パターンを示した。ニワトリ胚の前肢に *Pax1* を強制発現させた結果、軟骨形成の初期過程には影響が認められなかったものの、軟骨細胞の成熟及び内軟骨性骨形成が阻害され、軟骨の成長が著しく抑制された。*Pax1* を強制発現した軟骨細胞では、プロテオグリカンの蓄積が減少し、*Aggrecan* (*Agc1*) の著しい発現低下が認められた。培養軟骨細胞において *Pax1* を強制発現した結果、細胞形態が軟骨細胞に特徴的な多角型から線維芽細胞様の紡錘型へと変化した。また、*Pax1* の強制発現により、培養軟骨細胞における *Sox9*, *Nkx3.2*, *Indian hedgehog*, *type II collagen*, *Chondromodulin-1*, 及び *Agc1* といった軟骨マーカー遺伝子の発現が顕著に低下した。*Pax1* と同時に *Sox9* を強制発現した軟骨細胞では、*Pax1* を単独で強制発現した場合と比較して、軟骨マーカー遺伝子の発現がわずかに上昇したが、軟骨細胞の特徴はほとんど回復しなかった。本研究から、*Pax1* が軟骨細胞の成熟過程を阻害することが明らかになった。さらに *Sox9* の機能に対して *Pax1* が抑制的に作用することが示唆される結果が得られた。

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。*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、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。また、*flk1* (*vegfr2*) 遺伝子の血管内皮細胞特異的な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。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。

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 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 in a consistent manner 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 other cell types such as fibroblastic cells, suggesting that ChM-I acts through an endothelial cell-specific signal pathway that regulates the motility of ECs.

(2) The inactivation of ChM-I during endochondral bone formation.

Long bones, the majority of the skeleton, are first formed as cartilaginous molds during embryonic development. In the later stages of development, chondrocytes in the cartilaginous molds differentiate into hypertrophic/calcified cartilage, and allows vascular invasion from the surrounding tissue, which initiates bone formation (endochondral bone formation). ChM-I is a 25-kDa anti-angiogenic glycoprotein that localizes to the avascular region of cartilaginous molds (resting, proliferating, pre-hypertrophic cartilage). Interestingly, ChM-I deposited in the cartilaginous matrix clearly disappears in the hypertrophic/calcified zone of cartilage. This year, we addressed how

ChM-I is degraded and inactivated during endochondral bone formation.

Recently, we successfully obtained ChM-I monoclonal antibody (hCHM-05 antibody) by immunizing recombinant human ChM-I protein. Using this antibody, we detected an immunoreactive 14-kDa band as well as a 20-25 kDa broad band of the intact ChM-I in rib cartilage extracts. The 14-kDa short form of ChM-I was then purified by immunoprecipitation using hCHM-05 antibody. The N-terminal amino acid sequencing indicated that it was a N-terminal truncated form of ChM-I generated by the proteolytic cleavage at Asp³⁷-Asp³⁸ (14-kDa ΔN-ChM-I). Since this diacidic site is susceptible to V8 protease, the 14-kDa ΔN-ChM-I could be prepared by the limited digestion of recombinant human ChM-I. Boyden chamber assay showed that the 14-kDa ChM-I have little inhibitory activity on the VEGF-A-induced migration of vascular endothelial cells in contrast to the intact 20-25 kDa form of ChM-I. Moreover, immunohistochemistry with N-ChM-I antibody, which reacts with only the intact 20-25 kDa form of ChM-I, revealed that ChM-I was exclusively localized in the avascular zones, i.e. the resting, proliferating, and pre-hypertrophic zones, of the cartilaginous molds of developing long bone. In contrast, the 14-kDa form of ChM-I, which is recognized by hCHM-05 antibody, was found in the hypertrophic and calcified zones. Taking together, our results suggest that intact 20-25 kDa ChM-I is stored as a component of extracellular matrix in the avascular cartilage zones, but it is inactivated by a single N-terminal proteolytic cleavage in the hypertrophic zones of growth-plate cartilage prior to vascular invasion.

2. Analysis of the contribution of $Scx^+/Sox9^+$ progenitors to the establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament

In vertebrates, coordinated body movement is ensured by a close functional and physical association of bones, muscles, tendons and ligaments. Tendons connect muscles to the skeletal components and function as force transmitters, whereas ligaments bind bones together to stabilize joints. During the early stages of musculoskeletal development, cartilage, muscle, tendon and ligament primordia initially develop as an individual unit, but subsequently they are integrated with each other by an unknown mechanism.

SRY-box containing gene 9 (*Sox9*) and scleraxis (*Scx*) regulate cartilage and tendon formation, respectively. At the early stages of musculoskeletal development, both *Sox9* and *Scx* are detected in the subpopulation of tendon/ligament progenitors and chondroprogenitors. Lineage analysis crossing *ScxCre* transgenic mice with reporter mice revealed that *Scx*⁺ chondroprogenitors differentiate into chondrocytes near the chondro-tendinous/ligamentous junction during development.

Sox9 lineage tracing in the *Scx*⁺ domain revealed that *Scx*⁺ progenitors can be subdivided into two distinct populations with regard to their *Sox9* expression history: *Scx*⁺/*Sox9*⁺ and *Scx*⁺/*Sox9*⁻ progenitors. Tenocytes are derived from *Scx*⁺/*Sox9*⁺ and *Scx*⁺/*Sox9*⁻ progenitors. The closer the tendon is to the cartilaginous primordium, the more tenocytes arise from *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitors. Ligamentocytes as well as the annulus fibrosus cells of the intervertebral discs are descendants of *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitors. Conditional inactivation of *Sox9* in *Scx*⁺/*Sox9*⁺ cells causes defective formation in the attachment sites of tendons/ligaments into the cartilage, and in the annulus fibrosus of the intervertebral discs. Thus, the *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitor pool is a unique multipotent cell population that gives rise to tenocytes, ligamentocytes and chondrocytes during the establishment of the chondro-tendinous/ligamentous junction.

3. Inhibitory action of Pax1 on chondrocyte maturation.

Paired box gene 1 (Pax1) indirectly promotes the early stages of chondrogenic differentiation through induction and transactivation of *Nkx3 homeobox 2* (*Nkx3.2*), a transcriptional repressor. Later in chondrogenic differentiation, *Nkx3.2* blocks chondrocyte hypertrophy by repressing *Runt-related transcription factor 2* (*Runx2*). We demonstrate that Pax1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation, independently of *Nkx3.2*. Upon cartilage formation, *Pax1* expression in the ventral sclerotome was gradually decreased except for the perichondrial region of the vertebral bodies and the intervertebral region, both of which express *SRY-box containing gene 9* (*Sox9*). Forced expression of *Pax1* in the chick forelimb resulted in the formation of shortened skeletal elements with a significant reduction of proteoglycan accumulation in cartilage as well as a lack of the cortical bone formation and vascular invasion into primary ossification center. *Pax1*-misexpressing chondrocytes exhibited aberrant cell morphology with marked downregulation of *Aggrecan* (*Agc1*). Cultured *Pax1*-misexpressing chondrocytes failed to accumulate cartilaginous proteoglycans and became fibroblastic, in association with the marked downregulation of the expression of *Sox9*, *Nkx3.2*, *Indian hedgehog*, *type II collagen*, *Chondromodulin-1* as well as *Agc1*. In cultured chondrocytes, reduced accumulation of cartilaginous proteoglycans induced by the forced expression of *Pax1* was partially rescued by *Sox9* overexpression, but further promoted by *Nkx3.2* overexpression. Thus, the chondrogenic action of *Sox9* was antagonized by *Pax1*, which is downregulated during chondrogenic differentiation.

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 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 the 48 bp *col2a1* enhancer element, we have established a transgenic zebrafish line, *col2a1 : GFP*. In *col2a1 : GFP* at 2 days post fertilization (dpf), GFP expression was detected in cartilaginous elements such as pharyngeal arch and pectoral fin. Even at 21 dpf, EGFP was still detected in cartilaginous elements of *col2a1 : GFP* larvae. For visualization of the vascular network, we have also established a transgenic fish line, *flk1 : mCherry* that express red fluorescent protein, mCherry, under the control of promoter/enhancer elements of zebrafish *flk1/vegfr2* gene. We then obtained double transgenic *col2a1 : GFP ; flk1 : mCherry* by crossing *col2a1 : GFP* with *flk1 : mCherry*. These double transgenic *col2a1 : GFP ; flk1 : mCherry* enabled us to monitor both cartilage and blood vessel formation simultaneously. With confocal laser microscopy, we are currently investigating the formation of avascular cartilage with a focus on pectoral fin development.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Miura, S., Kondo, J., Takimoto, A., Sano-Takai, H., Guo, L., Shukunami, C., Tanaka, H. and Hiraki, Y. : The N-terminal

cleavage of Chondromodulin-I in growth-plate cartilage at the hypertrophic and calcified zones during bone development. PLOS ONE, **9**(4): e94239 (2014)

Austin, B.F., Yoshimoto Y., Shukunami, C. and Lincoln, J.: *Sox9*⁻ and Scleraxis-Cre Lineage Fate Mapping in Aortic and Mitral Valve Structures. J. Cardiovasc. Dev. Dis., **1**(2): 163-176 (2014)

Alberton, P., Dex, S., Popov, C., Shukunami, C., Schieker, M. and Docheva, D.: Loss of tenomodulin results in reduced self-renewal and augmented senescence of tendon stem/progenitor cells. Stem Cells Dev., in press

Takimoto, A., Kawatsu, M., Yoshimoto, Y., Kawamoto, T., Seiryu, M., Takano-Yamamoto, T., Hiraki, Y. and Shukunami, C.: Scleraxis and Osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. Development, in press

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

山下 寛, 宿南知佐, 開 祐司: ゼブラフィッシュを用いた Chondromodulin-I の軟骨特異的な転写制御機構の解析. 日本農芸化学会 2014 年度東京大会 (2014. 3. 28. 東京)

山下 寛, 宿南知佐, 開 祐司: ゼブラフィッシュ *Chm1* 遺伝子の軟骨特異的な発現を制御するシスエレメントの同定. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会 (2014. 5. 17. 京都)

郭 龍, 山下 寛, 黄 郁代, 滝本 晶, 安達泰治, 開 祐司, 池川志郎, 宿南知佐: Increased expression of the ladybird homeobox 1 (*lhx1*) cause scoliosis in zebrafish mimicking human adolescent idiopathic scoliosis and congenital scoliosis. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会 (2014. 5. 17. 京都)

山下 寛, 宿南知佐, 開 祐司: 軟骨特異的な Chondromodulin-I の転写制御領域のゼブラフィッシュを用いた in vivo スクリーニング. 第 46 回日本結合組織学会・第 61 回マトリクス研究会合同学術集会 (2014. 6. 5-7. 愛知)

杉本由紀, 滝本 晶, 開 祐司, 宿南知佐: Establishment of an in vivo model for analysis of periodontal ligament formation. 第 47 回広島大学歯学会総会 (2014. 6. 21. 広島)

杉本由紀, 滝本 晶, 西田圭一郎, 開 祐司, 宿南知佐: 運動器コンポーネントの連結におけるコラーゲン線維形成の機能的役割. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 (2014. 7. 24-26. 大阪)

滝本 晶, 開 祐司, 宿南知佐: 椎間板形成における Pax1 の役割. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 (2014. 7. 24-26. 大阪)

滝本 晶, 吉本由紀, 秋山治彦, 開 祐司, 宿南知佐: 腱・靱帯と骨格の付着部を形成する細胞の分化と系譜解析. 第 15 回運動器科学研究会 (2014. 9. 5. 東京)

山下 寛, 宿南知佐, 開 祐司: ゼブラフィッシュを用いた in vivo スクリーニングを用いた Chondromodulin-I の転写制御領域の解析. 第 15 回運動器科学研究会 (2014. 9. 5. 東京)

郭 龍, 山下 寛, 黄 郁代, 滝本 晶, 安達泰治, 開 祐司, 池川志郎, 宿南知佐: 思春期特発性側湾症の疾患感受性遺伝子である *Lbx1* の過剰発現はゼブラフィッシュにおいて側弯を誘導する. 第 15 回運動器科学研究会 (2014. 9. 5. 東京)

五藤紀子, 藤本勝巳, 依田浩子, 大島勇人, 河本健, 能城光秀, 宿南知佐, 香西克之, 加藤幸夫: ホメオボックス型転写因子 MSX1 による歯髄幹細胞の象牙芽細胞/骨芽細胞分化の制御. 第 15 回運動器科学研究会 (2014. 9. 5. 東京)

5. 東京)

Guo Long, Hiroshi Yamashita, Tetsushi Sakuma, Ikuyo Kou, Aki Takimoto, Takashi Yamamoto, Taiji Adachi, Yuji Hiraki, Shiro Ikegawa and Chisa Shukunami : Increased and decreased expression of the ladybird homeobox 1 cause scoliosis in zebrafish. 第4回ゲノム編集研究会(2014.10.6-7. 広島)

2) 講演・シンポジウム

宿南知佐：軟骨・腱・靱帯形成における Sox9 の関わり. 第27回日本軟骨代謝学会(2014.2.28. 京都)

宿南知佐：筋骨格系を連結する腱・靱帯形成の分子機構. 第27回骨代謝セミナー(2014.6.6. 東京)

Chisa Shukunami : Molecular mechanisms regulating tendon and ligament formation. 第11回 Bone Biology Forum (2014.8.23. 静岡)

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。再生医療とは、生体本来のもつ自然治癒力を介する医療である。自然治癒の基は細胞の増殖・分化能力であり、この細胞能力を高めることによって病気を治す。再生医療には病気を治す再生治療と将来の治療を科学的に支える再生研究がある。再生研究には、細胞能力を調べる細胞研究と細胞を用いて薬の作用や毒性を調べる創薬研究がある。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。通常、体内では細胞はその周辺環境と相互作用することによって生体、生物機能を発現している。そのため、いかに良い細胞が入手できても、細胞の周辺環境が整っていなければ細部機能は望めない。再生治療の実現には、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ることが多い。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。再生治療の実現に必要な細胞能力の解明には再生研究が重要である。前述の生体材料技術は再生研究にも応用可能である。

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・臓器の再生治療と再生研究のための生体材料、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、再生治療に必要な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) 幹細胞工学および再生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ー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ー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ーを用いて、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めている。

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。

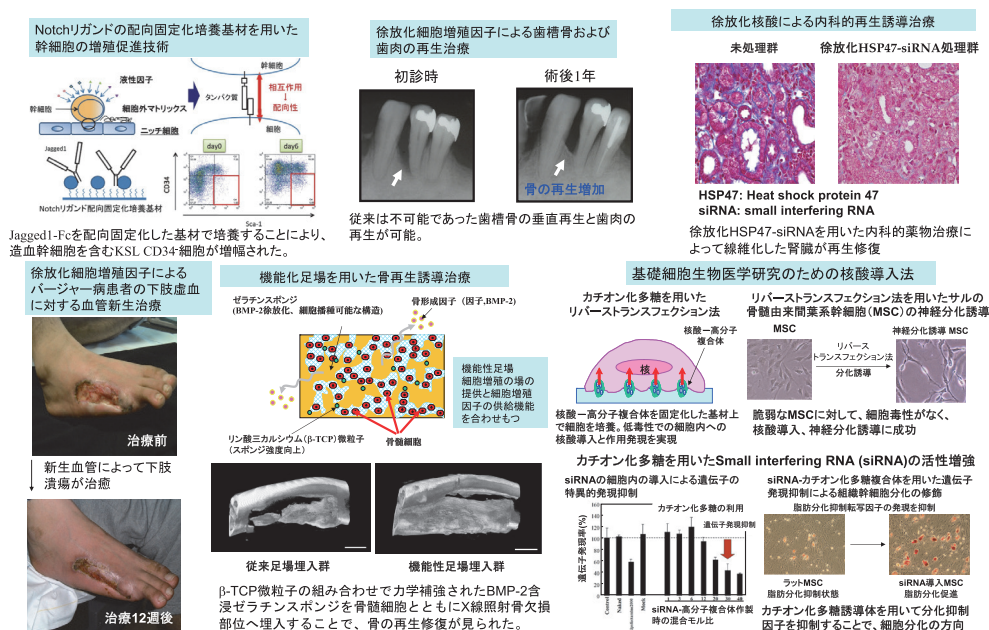
これまでの研究の経緯から、DDSの対象薬物は治療薬に集中していた。DDSの基本アイデアは、生物活性をもつ物質を全て薬物と考え、これらの物質と生体材料とを組み合わせることで、物質の生物活性を高めることである。つまり、DDSの対象となる薬物は、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などを含んでいる。われわれは、このような基本アイデアからDDSを考え、これを実現するための材料、技術、方法論についての研究開発を進めている。例えば、全身あるいは局所粘膜ワクチン薬、および核磁気共鳴イメージング(MRI)、超音波診断薬などに対して、DDS技術を適用すれば、予防ワクチンおよび診断効果は高まる。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 research 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 based on the natural healing potential of patients themselves, has been increasingly expected. This is called as termed the therapy of regenerative medicine. The healing potential is governed by the inherent potentials of cells for proliferation and differentiations. The regeneration and repairing of tissues are naturally induced to therapeutically treat diseases by artificially manipulating the cells potential. The regeneration medicine composed of regeneration therapy and regeneration research which scientifically supports the regeneration therapy of next generation. The objective of generation therapy is to regenerate injured or lost tissues and substitute organ functions by making use of the cell-based natural healing potential. The regeneration therapy 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 regeneration and repairing. 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 regeneration therapy of tissue, 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 physiologically 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 medical devices, DDS, and regeneration therapy or regeneration research of cell research and drug discovery.

Our research goal is to design and create biomaterials from polymers and the composites with metals or ce-

ramics 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 provide 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 Regeneration Research of Cell Biology and Drug discovery

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 biological and medical 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 prolonga-

tion 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 research 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

- Sasaki, N., Jo, J., Aoki, I., Sato, K. : Magnetic resonance imaging of a microvascular-interstitium model on a microfluidic device. *Analytical Biochemistry : Methods in the Biological Sciences*. **458** : 72-74 (2014)
- Tomitaka, A., Jo, J., Aoki, I., Tabata, Y. : Preparation of biodegradable iron oxide nanoparticles with gelatin for magnetic resonance imaging. *Inflammation and Regeneration*. **34**(1) : 45-55 (2014)
- Tanaka, H., Yamaguchi, S., Jo, J., Aoki, I., Tabata, Y., Takahashi, T. : Synthesis of a dextran-based bone tracer for in vivo magnetic resonance and optical imagings by two orthogonal coupling reactions. *RSC Advances*. **4** :

7561-7565(2014)

- Kim, Y. H., Furuya, H., Tabata, Y.: Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels. *Biomaterials*. **35**: 214-224(2014)
- Kimura, A., Kabasawa, Y., Tabata, Y., Aoki, K., Ohya, K., Omura, K.: Gelatin hydrogel as a carrier of recombinant human fibroblast growth factor-2 during rat mandibular distraction. *J Oral Maxillofac Surg*. **72**(10): 2015-31 (2014)
- Komura, M., Komura, H., Konishi, K., Ishimaru, T., Hoshi, K., Takato, T., Tabata, Y., Iwanaka, T.: Promotion of tracheal cartilage growth by intra-tracheal injection of basic fibroblast growth factor(b-FGF). *Journal of Pediatric Surgery*. **49**(2): 296-300(2014)
- 黒田良祐, 松下雄彦, 松本知之, 黒坂昌弘: -患者まで届いている再生医療-軟骨の再生. **217**(5): 4334-4338(2014)
- Matsumine, H., Sasaki, R., Tabata, T., Matsui, M., Yamato, M., Okano, T., Sakurai, H.: Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med*. (2014) In press.
- Matsuzaki, T., Matsushita, T., Tabata, Y., Saito, T., Matsumoto, T., Nagai, K., Kuroda, R., Kurosaka, M.: Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin-micelles reduces the development of experimental osteoarthritis in a murine model. *Biomaterials*. **35**(37): 9904-11(2014)
- Notodihardjo, P. V., Morimoto, N., Kakudo, N., Matsui, M., Sakamoto, M., Liem, P. H., Suzuki, K., Tabata, Y., Kusumoto, K.: Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model. *J Artif Organs*. (2014) in presst
- Hokugo, A., Saito, T., Li, A., Sato, K., Tabata, Y., Jarrahy, R.: Stimulation of bone regeneration following the controlled release of water-insoluble oxysterol from biodegradable hydrogel. *Biomaterials*. **35**: 5565-5571(2014)
- Saito, T., Tabata, Y.: Hypoxia-induced angiogenesis is increased by the controlled release of deferoxamine from gelatin hydrogels. *Acta Biomater*. **10**: 3641-3649(2014)
- Murakami, M., Saito, T., Tabata, Y.: Controlled release of sphingosine-1-phosphate agonist with gelatin hydrogels for macrophage recruitment. *Acta Biomater*. **10**: 4723-4729(2014)
- Matsuzaki, T., Matsushita, T., Tabata, Y., Saito, T., Matsumoto, T., Nagai, K., Kuroda, R., Kurosaka, M.: Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin-micelles reduces the development of experimental osteoarthritis in a murine model. *Biomaterials*. **35**: 9904-9911(2014)
- Thitiwuthikiat, P., Ii, M., Saito, T., Kanokpanont, S., Tabata, Y.: A vascular patch prepared from Thai silk fibroin and gelatin hydrogel incorporating simvastatin-micelles to recruit endothelial progenitor cells. *Tissue Eng Part A*. (2014) In press
- Shimizu, A., Tajima, S., Tobita, M., Tabata, Y., Mizuno, H.: Effect of control-released basic fibroblast growth factor incorporated in β -tricalcium phosphate for cranial regeneration in a murine model. *Plast Reconstr Surg Global Open*. **2**(3): 126(2014)
- Kim, Y. H., Furuya, H., Tabata, Y.: Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels. *Biomaterials*. **35**(1): 214-224(2014)
- Gaowa, A., Horibe, T., Kohno, M., Sato, K., Harada, H., Hiraoka, M., Tabata, Y., Kawakami, K.: Combination of hybrid peptide with biodegradable gelatin hydrogel for controlled release and enhancement of anti-tumor ac-

- tivity in vivo. *J Control Release*. **176** : 1-7 (2014)
- Lam, J., Lu, S., Meretoja, V.V., Tabata, Y., Mikos, A.G., Kasper, F. K. : Generation of osteochondral tissue constructs with chondrogenically and osteogenically pre-differentiated mesenchymal stem cells encapsulated in bilayered hydrogels. *Acta Biomater*. **10**(3): 1112-1123 (2014)
- Abd, El, Kader, T., Kubota, S., Nishida, T., Hattori, T., Aoyama, E., Janune, D., Hara, E. S., Ono, M., Tabata, Y., Kuboki, T., Takigawa, M. : The regenerative effects of CCN2 independent modules on chondrocytes in vitro and osteoarthritis models in vivo. *Bone*. **59** : 180-188 (2014)
- Tanaka, H., Yamaguchi, S., Jo, J., Aoki, I., Tabata, Y., Takahashi, T. : Synthesis of a dextran-based bone tracer for in vivo magnetic resonance and optical imaging by two orthogonal coupling reactions. *RSC Adv*. **4** : 7561-7565 (2014)
- Zhang, T. Y., Huang, B., Yuan, Z. Y., Hu, Y. L., Tabata, Y., Gao, J. Q. : Gene recombinant bone marrow mesenchymal stem cells as a tumor-targeted suicide gene delivery vehicle for pulmonary metastasis therapy using non-viral transfection. *Nanomedicine*. **10**(1): 257-267 (2014)
- Tomitaka, A., Jo, J., Aoki, I., Tabata, Y. : Preparation of biodegradable iron oxide nanoparticles with gelatin for magnetic resonance imaging. *Inflammation and Regeneration*. **34**(1): 45-55 (2014)
- Yamamoto, M., Ikada, Y., Tabata, Y. : Ultrastructure of bone tissue ectopically regenerated by biodegradable hydrogels incorporating bone morphogenetic protein 2. *Inflammation and Regeneration*. **34**(1): 56-63 (2014)
- Hussain, A., Takahashi, K., Sonobe, J., Tabata, Y., Bessho, K. : Bone regeneration of rat calvarial defect by magnesium calcium phosphate gelatin scaffolds with or without bone morphogenetic protein-2. *J Maxillofac Oral Surg*. **13**(1): 29-35 (2014)
- Hu, Y. L., Miao, P. H., Huang, B., Zhang, T. Y., Hu, Z. J., Tabata, Y., Gao, J.Q. : Reversal of tumor growth by gene modification of mesenchymal stem cells using spermine-pullulan/DNA nanoparticles. *J Biomed Nanotech*. **10**(2): 299-308 (2014)
- 山本雅哉, 田畑泰彦 : 糖応答分解性ハイドロゲル粒子を含む細胞凝集体の調製. *日本化学繊維研究所*. **71** : 1-5 (2014)
- 田畑泰彦 : 特集 4 総括・1 移植治療に用いる細胞の選択が大切! . *ザ・クインテッセンス*. **33**(4): 140 (2014)
- Ruan, G. X., Chen, Y. Z., Yao, X. L., Du, A., Tang, G. P., Shen, Y. Q., Tabata, Y., Gao, J. Q. : Macrophage mannose receptor-specific gene delivery vehicle for macrophage engineering. *Acta Biomater*. **10**(5): 1847-1855 (2014)
- Zhang, T. Y., Huang, B., Yuan, Z. Y., Hu, Y. L., Tabata, Y., Gao, J. Q. : Gene recombinant bone marrow mesenchymal stem cells as a tumor-targeted suicide gene delivery vehicle in pulmonary metastasis therapy using non-viral transfection. *Nanomedicine*. **10**(1): 257-67 (2014)
- Minagawa, T., Tabata, Y., Oyama, A., Furukawa, H., Yamao, T., Yamamoto, Y. : Controlled release of granulocyte colony-stimulating factor enhances osteoconductive and biodegradable properties of beta-tricalcium phosphate in a rat calvarial defect model. *Int J Biomater*. **11** (2014)
- Itani, Y., Asamura, S., Matsui, M., Tabata, Y., Isogai, N. : Evaluation of nanofiber-based polyglycolic acid scaffolds for improved chondrocyte retention and in vivo bioengineered cartilage regeneration. *Plast Reconstr Surg*. **133**(6): 805-813 (2014)
- Matsumine, H., Sasaki, R., Tabata, Y., Matsui, M., Yamato, M., Okano, T., Sakurai, H. : Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model. *J Tissue Eng Regen*

- Med. in press(2014)
- Hokugo, A., Saito, T., Li, A., Sato, K., Tabata, Y., Jarrahy, R.: Stimulation of bone regeneration following the controlled release of water-insoluble oxysterol from biodegradable hydrogel. *Biomaterials*. **35**(21):5565-5571 (2014)
- Hakuba, N., Tabata, Y., Hato, N., Fujiwara, T., Gyo, K.: Gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor for tympanic membrane regeneration. *Otol Neurotol*. **35**(3):540-544(2014)
- Tan, G. K., Tabata, Y.: Chondroitin-6-sulfate attenuates inflammatory responses in murine macrophages via suppression of NF- κ B nuclear translocation. *Acta Biomater*. **10**(6):2684-2692(2014)
- Kawago, M., Yoshimasu, T., Tabata, Y., Yamamoto, M., Hirai, Y., Kinoshita, T., Okamura, Y.: Intrapleural administration of gelatin-embedded, sustained-release basic fibroblast growth factor for the regeneration of emphysematous lungs in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. **147**(5):1644-1649(2013)
- Kinard, L. A., Dahlin, R. L., Henslee, A. M., Spicer, P. P., Chu, C. Y., Tabata, Y., van den Beucken, J. J., Jansen, J. A., Young, S., Wong, M. E., Kasper, F. K., Mikos, A. G.: Tissue response to composite hydrogels for vertical bone augmentation in the rat. *J Biomed Mater Res A*. **102**(7):2079-2088(2014)
- Furuya, H., Tabata, Y., Kaneko, K.: Bone regeneration for murine femur fracture by gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor with different release profiles. *Tissue Eng Part A*. **20**(9-10):1531-1541 (2014)
- 金指幹元, 宮本正章, 長野孝俊, 日下輝雄, 田畑泰彦, 五味一博: 薬物送達システム徐放化多血小板血漿(DDS-PRP)を用いた歯周組織再生療法の確立と安全性検証. 臨床薬理の進歩. 138-147(2014)
- Tsuzuki, N., Oshita, N., Seo, J. P., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Effect of platelet-rich plasma-incorporated gelatin hydrogel microspheres and subchondral drilling on equine cartilage defects. *J Equine Vet Science*. **34**(6):820-824(2014)
- 長島剛史, 奥原秋津, 都築直, 徐鍾筆, 上林義範, 内山裕貴, 真鍋弘行, 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セフトロキサム含有乳酸・グリコール酸コポリマーシートの効果. 北獣会誌. **58**(2):40-43(2014)
- Omata, K., Matsuno, T., Asano, K., Hashimoto, Y., Tabata, Y., Satoh, T.: Enhanced bone regeneration by gelatin- β -tricalcium phosphate composites enabling controlled release of bFGF. *J Tissue Eng Regen Med*. **8**(8):604-611(2014)
- Tsuzuki, N., Nakao, S., Seo, J. P., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N.: Effect of biodegradable gelatin β -tri calcium phosphate sponges containing mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein-2 on equine bone defect. *Vet Res Commun*. **38**(1):73-80(2014)
- Suzuki, T., Tobe, M., Obata, H., Tabata, Y., Saito, S.: Efficacy and duration of analgesia from a sustained-release lidocaine sheet in humans. *International Journal of Drug Delivery*. **6**(1):75-81(2014)
- Lam, J., Kim, K., Lu, S., Tabata, Y., Scott, D. W., Mikos, A. G., Kasper, F. K.: A factorial analysis of the combined effects of hydrogel fabrication parameters on the in vitro swelling and degradation of oligo(poly(ethylene glycol)fumarate)hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. **102**(10):3477-3487(2014)
- Lam, J., Lu, S., Lee, E. J., Trachtenberg, J. E., Meretoja, V. V., Dahlin, R. L., van den Beucken, J. J., J. P., Tabata, Y., Wong, M. E., Jansen, J. A., Mikos, A. G.: Osteochondral defect repair using bilayered hydrogels encapsulating

- both chondrogenically and osteogenically pre-differentiated mesenchymal stem cells in a rabbit model. Osteoarthritis Cartilage. **22**(9): 1291-1300(2014)
- Ikeda, M., Uemura, T., Takamatsu, K., Okada, M., Kazuki, K., Tabata, Y., Ikada, Y., Nakamura, H.: Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. J Biomed Mater Res A. **102**(5): 1370-1378 (2014)
- Tanaka, A., Hasegawa, T., Morimoto, K., Bao, W., Yu, J., Okita, Y., Tabata, Y., Okada, K.: Controlled release of ascorbic acid from gelatin hydrogel attenuates abdominal aortic aneurysm formation in rat experimental abdominal aortic aneurysm model. J Vasc Surg. **60**(3): 749-758(2014)
- Steven, L., Lam, J., Trachtenberg, J. E., Lee, E. J., Seyednejad, H., van den Beucken, J. J. P., Tabata, Y., Wong, M. E., Jansen, J. A., Mikos, A. G., Kasper, F. K.: Dual growth factor delivery from bilayered, biodegradable hydrogel composites for spatially-guided osteochondral tissue repair. Biomaterials. **35**(31): 8829-8839(2014)
- Matsuzaki, T., Matsushita, T., Tabata, Y., Saito, T., Matsumoto, T., Nagai, K., Kuroda, R., Kurosaka, M.: Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin-micelles reduces the development of experimental osteoarthritis in a murine model. Biomaterials. **35**(37): 9904-9911(2014)
- Notodihardjo, P. V., Morimoto, N., Kakudo, N., Matsui, M., Sakamoto, M., Liem, P. H., Suzuki, K., Tabata, Y., Kusumoto, K.: Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model. J Artif Organs. in press
- Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y., Economides, A. N., Slavkin, H. C., Bessho, K.: Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formations. PLoS ONE. **9**: 96938(2014)
- Hussain, A., Bessho, K., Takahashi, K., Tabata, Y.: Magnesium calcium phosphate / β -tricalcium phosphate incorporation into gelatin scaffold, in vitro comparative study. J Tissue Eng Regen M. **8**: 919-924(2014)
- Hussain, A., Takahashi, K., Sonobe, J., Tabata, Y., Bessho, K.: Bone regeneration of rat calvarial defect by magnesium calcium phosphate gelatin scaffolds with or without bone morphogenetic protein-2. J Maxillofac Oral Surg. **13**: 75-77(2014)
- 鷺尾絢子, 田畑泰彦, 西原達次, 北村知昭: バイオガラス: 象牙質・歯髄の局所的再生療法への応用. In: 特集次世代の歯の治療－歯髄・根尖歯周組織の再生－①. 歯界展望 **124**(1): 109-112(2014)
- Kawago, M., Yoshimasu, T., Tabata, Y., Yamamoto, M., Hirai, Y., Kinoshita, T., Okamura, Y.: Intrapleural administration of gelatin-embedded, sustained-release basic fibroblast growth factor for the regeneration of emphysematous lungs in rats. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. **147**: 1644-1649(2014)
- Yamamoto, M., Ikada, Y., Tabata, Y.: Ultrastructure of bone tissue ectopically regenerated by biodegradable hydrogels incorporating bone morphogenetic protein-2. Inflammation and Regeneration. **34**: 56-63(2014)
- 山本雅哉, 田畑泰彦: 糖応答分解性ハイドロゲル粒子を含む細胞凝集体の調製. 日本化学繊維研究所講演集. **71**: 1-5(2014)

2) 著 書

城潤一郎, 田畑泰彦: 合成高分子(生体吸収性). 「遺伝子医学 MOOK 別冊細胞の3次元組織化に不可欠な最先端

材料技術－再生医療、その支援分野(細胞研究、創薬研究)への応用と発展のために」(田畑泰彦編, メディカルドゥ, 大阪)59-63(2014)

神田勝弘: ナノピラープレート(3D 細胞培養器材). 「細胞の3次元組織化－その最先端技術と材料技術 再生医療とその支援分野(細胞研究、創薬研究)への応用と発展のために」(田畑泰彦編集, メディカルドゥ, 大阪市)106-111(2014)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Protocol of osteoblastic differentiation of BMSC in biodegradable scaffolds composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. 「A Manuals for Differentiation of Bone Marrow Derived Stem Cells to Specific Cell Types」(Khang, G., Shimizu, T., Ng, K. W. Eds., World Scientific Publishing Inc., Singapore)83-90(2014)

山本雅哉: 骨形成因子徐放化ハイドロゲルによる骨再生の増強－生体吸収性ハイドロゲルによる骨形成因子の徐放化－. 「バイオマテリアル研究の最前線」(成島尚之, 中野貴由編, 公益財団法人日本金属学会, 仙台)163-164(2014)

山本雅哉, 田畑泰彦: 第5章, 第4節ゼラチンヒドロゲルを用いた再生医療. 「ゲルテクノロジーハンドブック」(中野義夫監修, エヌ・ティー・エス, 東京)775-782(2014)

3) 総説

Bennett, K. M., Jo, J., Cabral, H., Bakalova, R., Aoki, I.: MR imaging techniques for nano-pathophysiology and theranostics. Advanced Drug Delivery Reviews. **74**: 75-94(2014)

宮本正章, 久保田芳明, 桐木園子, 手塚晶人, 川中秀和, 太良修平, 高木元, 汲田伸一郎, 水野博司, 田畑泰彦: 治療抵抗性末梢動脈疾患(PAD)に対する血管再生治療. 日本フットケア学会雑誌. **12**: 1-7(2014)

田畑泰彦: 先端医療に向けたバイオマテリアル概念. バイオマテリアル－生体材料. **32**(1): 48-50(2014)

Tabata, Y.: Positioning of tissue engineering in regenerative medicine. Inflammation and Regeneration. **34**(1): 1-3(2014)

田畑泰彦: 自然治癒力を高める医療「再生医療」－再生治療と再生研究－. 薬剤学. **74**(3): 202-208(2014)

田畑泰彦: 再生医療を本格化するバイオマテリアル技術. 最新医学. **69**(7): 1417-1426(2014)

田畑泰彦: 再生医療に必要な不可欠な DDS. 医薬ジャーナル. **50**(7): 73-76(2014)

田畑泰彦: 第2編培地・添加剤・輸送 第8章足場材料の現状と今後再生医療の細胞培養技術と産業展開. in press

Yamamoto, M., Rafii, S., Rabbany S. Y.: Scaffold biomaterials for nano-pathophysiology. Adv. Drug Deliv. Rev. **74**: 104-114(2014)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

有本晃佑, 佐藤香枝, 山本雅哉, 田畑泰彦: コラーゲンゲル中に作製した 管腔構造内における血管内皮細胞の培養. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)

有本晃佑, 佐藤香枝, 山本雅哉, 田畑泰彦: 刺激応答性材料により作製した管腔構造内での血管内皮細胞の培養. 第35回炎症再生医学会(2014.7.1-4. 沖縄)

有本晃佑, 佐藤香枝, 山本雅哉, 田畑泰彦: コラーゲンゲル中に作製した 管腔構造内における血管内皮細胞の動

- 態. 日本バイオマテリアル学会第9回関西若手研究発表会(2014.8.5. 京都)
- 有本晃佑, 佐藤香枝, 山本雅哉, 田畑泰彦: 刺激応答性材料を用いた血管様構造の作製と血管内皮細胞の動態. 第36回日本バイオマテリアル学会(2014.11.17-18. 東京)
- 千野裕太郎: 上皮増殖因子をパターン固定化したポリアクリルアミドゲルの作製. 第9回関西若手研究発表会(2014.8.5. 京都)
- 千野裕太郎: 生理活性物質をパターン固定化したポリアクリルアミドハイドロゲル細胞培養基材の作製. 第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014.11.17-18. 東京)
- 平井健次郎, 土黒一郎, 隅田仁, 和田聡朗, 星野伸晃, 郡司周太郎, 肥田侯矢, 河田健二, 長谷川傑, 森紗也香, 田能村昌久, 田畑泰彦, 坂井義治: 非ラメラ液晶脂質スプレーによる癒着防止効果の検討. 第114回日本外科学会定期学術集会(2014.4.3-5. 京都)
- Horie, R. T., Saito, T., Jo, Junichiro., Tabata, Y.: Water-solubilized of Hydrophobic Dexamethasone using L-lactic acid oligomer. Inner Ear Biology Workshop 2014(2014.11.1-4. Kyoto)
- 堀江理恵, 中井麻佐子, 相宗菜摘, 平井よう子: 滋賀県における難聴児の発生率と難聴診断後の療育介入の現状. 第59回日本聴覚医学会総会・学術講演会 (2014.11.27-28. 山口)
- 星 嵩, 秋月達也, 松浦孝典, 井川貴博, 丸山起一, 小野 彌, 松井 誠, 田畑泰彦, 和泉雄一: β -TCPゼラチンハイドロゲル、リコンビナントヒト塩基性線維芽細胞増殖因子を使用した顎堤増大術-ビーグル犬顎堤欠損モデル-. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- Shintani, T., Ii, M., Saito, T., Tabata, Y., Asahi, M.: Synergistic effect of local/controlled-release statin and adipose-derived stem cells in a mouse hind limb ischemia model. 2014 International Society For Stem Cell Research (2014.6.18-20. Vancouver)
- Yokoyama, R., Ii, M., Tabata, Y., Asahi, M.: Unique therapeutic effect of statin nanoparticle-loaded adipose-derived stem cells on myocardial infarction. 2014 American Heart Association(2014.11.16-19. Chicago)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 再生治療効果の磁気共鳴イメージングを目指した高分子造影剤の創製. 京都大学工学研究科高等研究院生体医工学研究部門平成25年度第2回研究発表交流会(2014.3.11. 京都)
- 城潤一郎, 新井和孝, 佐賀恒夫, 青木伊知男, 田畑泰彦: 高感度MRIを目指したマンガンイオン内包ナノ粒子の作製. 第10回日本分子イメージング学会総会・学術集会(2014.5.22-23. 大阪)
- Jo, J., Lin, X., Aoki, I., Saga, T., Tabata, Y.: Visualization of Therapeutic Effect for Angiogenesis with a Polymer-Based Magnetic Resonance Imaging Probe. 41st Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (2014. 7.13-16. Chicago)
- 城潤一郎, 青木伊知男, 佐賀恒夫, 田畑泰彦: 単球/マクロファージの誘引と活性化とを同時に可能にするナノ粒子の作製とがん治療への展開. 第30回日本DDS学会学術集会(2014.7.30-31. 東京)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 再生治療イメージングのための水溶性多糖を基盤とするハイブリッドバイオマテリアルの開発. 第63回高分子討論会(2014.9.24-26. 長崎)
- 城潤一郎, 永田純平, 松井 誠, 山本雅哉, 田畑泰彦: バイオマテリアルを利用した物質の細胞内導入技術による細胞の生物機能改変. 京都大学ウイルス研究所・再生医科学研究所合同学術講演会(2014.12.22. 京都)
- 覚道奈津子, 森本尚樹, 日原正勝, 尾川武史, Notodihardjo, P. V., 楠本健司, 松井 誠, 田畑泰彦: 多血小板血漿とゼラチンハイドロゲルを用いた血管新生効果の検討. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会(2014.10.9-10. 松本)

- 覚道奈津子, 森本尚樹, 日原正勝, 尾川武史, Notodihardjo, P. V., 楠本健司, 松井 誠, 田畑泰彦: 多血小板血漿とゼラチンハイドロゲルを用いた血管新生効果の検討. 第6回多血小板血漿(PRP)療法研究会(2014.11.16. 大阪)
- 金 亮希, 田畑泰彦: Effect of stromal cell-derived factor-1 and a macrophage recruitment agent release on wound healing. 第13回再生医療学会抄録(2014.3.4-6. 京都)
- Kim, Y. H., Tabata, Y.: Synergistic effects of dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophages recruitment agent from gelatin hydrogel on wound healing. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society-Europe(2014.6.10-13. Genova)
- 金 亮希, 田畑泰彦: Effect of macrophages and MSC recruitment by dual release of a macrophage recruitment agent and stromal cell-derived factor-1 from gelatin hydrogel. 第35回日本炎症・再生医学会(2014.7.1-4. 沖縄)
- Kim, Y. H., Furuya, H., Tabata, Y.: Enhancement of bone regeneration by dual release of a macrophage recruitment agent and platelet-rich plasma from gelatin hydrogels. 第21回BMP研究会(2014.7-27. 大阪)
- 金 亮希, 田畑泰彦: Enhancement of dual release of stromal derived factor-1 and a macrophage recruitment agent on tissue regeneration. 第9回関西若手研究発表会(2014.8.5. 京都)
- Kim, Y. H., Tabata, Y.: Enhancement of wound healing by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophages recruitment agent from gelatin hydrogel. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society-Asia Pacific(2014.9.24-27. Daegu)
- Kim, Y. H., Tabata, Y.: Enhancing macrophage recruitment by controlling scaffold pore size. BioMedical Engineering Society Annual Meeting(2014.10.22-25. San Antonio)
- 金 亮希, 田畑泰彦: Controlled release of a macrophages recruitment agent and bone morphogenetic protein-2 from gelatin hydrogels. 第36回日本バイオマテリアル学会(2014.11.17-18. 東京)
- 木村 敦, 樺沢勇司, 佐藤 昌, 高原楠旻, 樋口佑輔, 松本佳奈子, 田畑泰彦, 田村幸彦, 青木和広, 大谷啓一, 小村 健: ラット下顎骨延長におけるbFGF含有gelatin hydrogelの有用性. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- Sugamori, Y., Honma, M., Kato, G., Tamura, Y., Furuya, Y., Yasuda, H., Tabata, Y., Udagawa, N., Ohya, K., Suzuki, H., Aoki, K.: RANKL-binding peptides increased bone formation in a murine calvarial defect model. アメリカ骨代謝学会 ASBMR2014(2014.9.12-15. Houston, Texas)
- 古村 眞, 古村浩子, 大谷裕之, 星 和人, 高戸 毅, 田畑泰彦, 岩中 督: 塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)の徐放化による軟骨再生過程の検討. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4. 京都)
- 古村 眞, 佐竹亮介, 寺脇 幹, 小高哲郎, 鈴木啓介, 古村浩子, 大谷裕之, 石丸哲也, 小西健一郎, 岩中 督, 星 和人, 高戸 毅, 田畑泰彦: 気管狭窄症に対する低侵襲術式開発のための食道壁軟骨再生の為の研究(2014.3.5. 京都)
- Komura, M., Otani, Y., Komura, H., Tabata, Y.: Optimal amount of Basic Fibroblast Growth Factor(b-FGF)in gelatin sponges incorporating β -tricalcium phosphate(β -TCP)with chondrocytes(2014.12.14. Washington DC)
- 黒田良祐, 松崎時夫, 松下雄彦, 松本知之, 黒坂昌弘, 田畑泰彦: ゼラチンハイドロゲル DDS 技術を取り入れた骨・軟骨再生医療. 第30回日本 DDS 学会学術集会(2014.7.30-31. 東京)
- 松峯 元, 佐々木亮, 田畑泰彦, 松井 誠, 大和雅之, 岡野光夫, 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13回再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- Matsuzaki, T., Matsushita, T., Tabata, Y., Saito, T., Matsumoto, T., Nagai, K., Uefuji, A., Nakano, N., Kurosaka, M., Kuroda, R.: Intra-articular administration of gelatin hydrogels incorporating rapamycin-micelle reduces development of experimental osteoarthritis in a murine model. The 61th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society(2014.3.15-18. New Orleans)
- 石原久子, 飛田護邦, 田中里佳, 田島聖士, 田畑泰彦, 水野博司: 徐放型 bFGF と脂肪組織由来幹細胞の相互作用による血管新生の検証. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- 森本尚樹, Priscilla, V. N., 覚道奈津子, 小倉常敬, 原 朋也, 松井 誠, 田畑泰彦, 楠本健司: PRP とゼラチンシートの併用療法による難治性皮膚潰瘍に対する臨床試験. 第4回 DDS 再生医療研究会(2014.12.6. 東京)
- 永田純平, 松井 誠, 田畑泰彦: 細胞内オートファジー制御を目指したラパマイシン細胞内徐放. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- 松井 誠, 永田純平, 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によるオートファジー誘導. 第30回日本 DDS 学会(2014.7.30-31. 東京)
- 永田純平, 松井 誠, 田畑泰彦: 生体吸収性微粒子を用いたラパマイシン細胞内徐放とオートファジー制御. 日本バイオマテリアル学会第9回関西若手研究発表会(2014.8.5. 京都)
- Nagata, J., Matsui, M., Tabata, Y.: Autophagy Modification by Intracellular Controlled Release of Rapamycin. 26th Annual conference European Society of Biomaterials(2014.8.31-9.3. Liverpool)
- 永田純平, 松井 誠, 田畑泰彦: オートファジー活性を制御する生体吸収性微粒子の作製. 第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014.11.17-18. 東京)
- 西本慶喜, 城潤一郎, 田畑泰彦: 遺伝子キャリアとしてのスベルミン導入ブルランの作製. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- 西本慶喜, 城潤一郎, 田畑泰彦: siRNA 細胞内導入キャリアとしての PEI 導入ゼラチンの作製. 日本バイオマテリアル学会第9回関西若手研究発表会(2014.8.5. 京都)
- 西本慶喜, 城潤一郎, 田畑泰彦: siRNA 細胞内導入キャリアとしての PEI 導入ゼラチンの作製. 第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014.11.17-18. 東京)
- 齊藤高志, 田畑泰彦: 骨分化誘導因子徐放化ゼラチンスポンジを用いた骨髄間葉系幹細胞の骨分化. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4. 京都)
- 齊藤高志, 田畑泰彦: デキサメサゾン／活性型ビタミン D₃ 徐放化3次元細胞足場による幹細胞骨分化. 日本バイオマテリアル学会第9回関西若手研究発表会(2014.8.5. 京都)
- 齊藤高志, 田畑泰彦: 幹細胞骨分化誘導のためのデキサメサゾン／活性型ビタミン D₃ 徐放化3次元細胞足場の作製. 第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014.11.17)
- 高田聡, 中村陽子, 河合勝也, 鈴木茂彦, 田畑泰彦: ゼラチン粒子を含む軟骨膜細胞シート複合体の作製. 第36回日本バイオマテリアル学会大会(2014.11.17-18. 東京)
- 喜早はのか, 高橋 克, 斎藤和幸, 東郷由弥子, 塚本容子, 田畑泰彦, 別所和久: USAG-1 と BMP-7 の歯数制御に関する機能解析. 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- 喜早はのか, 高橋 克, 斎藤和幸, 東郷由弥子, 塚本容子, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦, 別所和久: マウスの上顎切歯部では, USAG-1 は BMP-7 に拮抗し, 歯数制御に関与する. 第45回骨・カルシウム代謝研究会(2014.11.14. 京都)

- 三島清香, 田村佳代, 高橋 克, 松井 誠, 池田隆文, 田畑泰彦, 清水 章, 別所和久: 多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる骨再生. 第 6 回 PRP 療法研究会 (2014.11.16. 大阪市)
- 高澤慎也, 小室広昭, 古村 眞, 藤代 準, 杉山正彦, 新井真理, 石丸哲也, 田畑泰彦, 岩中 督: 徐放化 bFGF 羊水腔内投与は肺の成熟を促進する - 遺伝子発現からの検討 -. 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3.4-6. 京都)
- 鷺尾絢子, 松井 誠, 北村知昭, 田畑泰彦: 歯髄・根尖歯周組織の再生誘導における無機生体材料およびゼラチンハイドロゲルの有効性の検討. 第 13 回日本再生医療学会 (2014.3.4-6. 京都)
- 鷺尾絢子, 田畑泰彦, 北村知昭: 根尖部の慢性炎症制御を目的としたヒドロコルチゾン含有 PLGA 粒子の作製. 第 140 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2014.6.19-20. 滋賀)
- 鷺尾絢子, 田畑泰彦, 北村知昭: 象牙質・歯髄複合体の再生誘導に用いるゼラチン-バイオガラス複合スポンジの検. 第 35 回日本歯内療法学会学術大会 (2014.7.12-13. 新潟)
- Washio, A., Tabata, Y., Kitamura, C.: Preparation of gelatin and bioglass sponge composites capable of fibroblast growth factor 2 release for dentin and pulp regeneration. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (2014.11.5-7. Kitakyushu)
- 鷺尾絢子, 北村知昭, 田畑泰彦: 象牙質・歯髄複合体形成におけるゼラチン-バイオガラス複合スポンジの有効性の検討. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11.17-18. 東京)
- Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Sandwich culture using bio-functional hydrogels as a three-dimensional culture model for mesenchymal stem cells. Society for Biomaterials 2014 Annual meeting and Exposition (2014.4.18. Denver)
- Toda, H., Yamamoto, M., Tabata, Y.: Enhanced osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells by sandwich culture with bio-functional hydrogels. TERMIS-EU2014 (2014.6.11. Geona)

2) 講演・シンポジウム

- 城潤一郎, 青木伊知男, 佐賀恒夫, 田畑泰彦: DDS 技術を用いた MRI による再生治療効果の可視化. 第 13 回日本再生医療学会シンポジウム「細胞運命と機能の可視化・バイオイメージング」(2014.3.4-6. 京都)
- 城潤一郎: 生体材料を用いた薬物送達技術による再生治療効果の生体イメージング. 日本生物物理学会九州支部・熊本大学イメージングセミナー「若手イメージング研究者の集い-生命現象を視てわかるサイエンスの現場から-」(2014.4.25-26. 熊本)
- 城潤一郎, 田畑泰彦: 高分子造影剤による再生治療効果の生体イメージング. 「第 7 回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム」(2014.6.13-14. 福岡)
- 金 亮希, 田畑泰彦: Enhancement of bone regeneration by controlled release of bone morphogenetic protein-2 and a macrophage recruitment agent from gelatin hydrogel. 「KIPS 若手高分子シンポジウム」(2014.12.12. 京都)
- 黒田良祐: 膝の痛み、そして先端医療-関節は再生できるのか? -, 「第 13 回日本再生医療学会総会市民公開講座」(2014.3.3. 京都)
- Tabata, Y.: Biomaterials based regenerative medicine. 「The 2nd International Conference on Medical Materials, Devices and Regenerative Medicine」(2014.1.11-13. Kathmandu)
- 田畑泰彦: バイオマテリアル技術からみた先端医療と研究「関西大学院理工学部講義」(2014.1.21. 大阪)

田畑泰彦：再生医療の最先端の現場で必要なものづくり. 「ウェルネス産業人材育成セミナー」(2014.1.24. 京都)

田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた先端医療－再生治療と再生研究－. 「第5回先進医療フォーラム」
(2014.1.25. 東京)

田畑泰彦：バイオマテリアルから見た再生医療の世界－再生治療と再生研究－. 「東京医科歯科大学講義」(2014.1.30.
東京)

田畑泰彦：モノづくり技術からみた再生研究と再生治療. 「日立製作所講演会」(2014.1.31. 日立)

田畑泰彦：もの作りからみた再生治療と再生研究. 「浜松ホトニクス株式会社講演会」(2014.2.3. 浜松)

田畑泰彦：再生医療への科学技術インテグレーション－再生研究と再生治療－. 「日本再生医療学会エデュケーション
ナルセミナー」(2014.2.4. 東京)

田畑泰彦：材料科学技術からみた再生医療－再生治療と再生研究－. 「旭硝子株式会社講演会」(2014.2.17. 横浜)

田畑泰彦：生体機能性高分子…からだを治すポリマー. 「平成25年度KIPS高分子講座2013」(2014.2.19. 京都)

田畑泰彦：3次元細胞培養に必要となるバイオマテリアル技術. 「2013年度特別学術講演会」(2014.2.26. 京都)

田畑泰彦：材料技術からみた再生医療－再生治療と再生研究－. 「学振薄膜第131委員会2014年02月研究会」
(2014.2.27. 京都)

田畑泰彦：自然治癒力を高めて病気を治す－患者さんのための再生医療を目指して－. 「市民公開講座」(2014.3.3.
京都)

田畑泰彦：再生治療効果に与える炎症の影響について考える. 「第13回日本再生医療学会総会」(2014.3.4-6. 京都)

田畑泰彦：再生医療への科学技術インテグレーション－再生研究と再生治療－. 「第13回日本再生医療学会総会」
(2014.3.4-6. 京都)

田畑泰彦：再生研究と治療に不可欠なモノづくり. 「第13回日本再生医療学会総会」(2014.3.4-6. 京都)

田畑泰彦：自然治癒再生医療のための組織工学 DDS 技術の開発. 「第13回日本再生医療学会総会」(2014.3.4-6. 京
都)

田畑泰彦：自然治癒力を高めて病気を治す～再生医療はここまできている～. 「平成25年度芦屋川カレッジ講演
会」(2014.3.12. 芦屋)

田畑泰彦：材料科学からみた先端医療とライフサイエンス. 「小林製薬株式会社講演会」(2014.3.24. 茨木)

田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた先端医療－再生医療を例として－. 「日本化学会第94回春季大会」(特別
講演)(2014.3.27. 名古屋)

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－. Regenerative Medicine from the View-
point of Biomaterials –Regenerative Therapy and Regenerative Research－. 「日本薬学会第134年会」(特
別講演)(2014.3.28. 熊本)

田畑泰彦：再生治療と再生研究の将来. (特別講演)「横浜鶴見歯周病研究会」(2013.3.30. 横浜)

田畑泰彦：バイオマテリアルと先端医療. 「東大工学系研究科ナノバイオ工学講義」(2014.4.9. 東京)

田畑泰彦：自然治癒力を高めて病気を治す－再生治療と再生研究－. 「ISPE 日本本部2014年度年次大会」(基調
講演)(2014.4.10. 東京)

田畑泰彦：高分子材料からみた再生研究と再生治療. 「高分子同友会勉強会」(2014.4.15. 大阪)

Tabata, Y.: Regenerative Medicine Based on Biofunctional Materials –Regenerative Therapy and Regenerative
Research－. 「The 1st East Asian Forum on Biofunctional Materials and Regenerative Medicine」(2014.4.19.
Hangzhou)

- 田畑泰彦：研究・治療に分けて再生医療材料・機器ビジネスを考える。平成 26 年度 KRP「再生医療サポートビジネス懇話会」(2014.4.23. 京都)
- 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](2014.5.16 京田辺)
- Tabata, Y.: Biomaterials Technology Indispensable for Regenerative Medicine Regeneration Therapy and Regeneration Research. [The 3rd International Scientific Conference “Regenerative Medicine and Healthy Aging”](2014.5.22-23. Astana)
- 田畑泰彦：医療と医学研究に不可欠なバイオマテリアル技術。[平成 26 年度春期グレーター東大塾](2014.5.27. 東京)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルを用いた再生医療。[大阪大学歯学研究科講義](2014.5.30. 茨木)
- Tabata, Y.: Tissue Engineering-Based Regenerative Medicine. [Bandung Institute of Technology Meeting](2014.6.2-3. Bandung)
- 田畑泰彦：ハイドロゲルバイオマテリアルを用いた薬物徐放技術。[文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究(研究領域提案型)」がん微小環境ネットワークの統合的研究平成 26 年度第 1 回班会議](2014.6.5. 東京)
- Tabata, Y.: Frontier of regeneration therapy based on tissue engineering and stem cells. [TERMIS-EU Meeting 2014](2014.6.10-13. Genova)
- 田畑泰彦：再生医療を支える材料装置技術。[澁谷工業株式会社講演](2014.6.17. 金沢)
- Tabata, Y.: Biomaterials-Based Tissue Regeneration Therapy. [5th International Conference on Tissue Engineering](2014.6.20-25. Kos)
- 田畑泰彦：歯の治療学。[九州歯科大学特別講義](2014.6.27. 北九州)
- Tabata, Y.: Biomaterials and Tissue Engineering. [Chulalong korn University Seminar](2014.7.8. Bangkok)
- 田畑泰彦：再生医療とは 真如苑総会(2014.7.12. 高槻)
- Tabata, Y.: Visualization of Therapeutic Effect for Angiogenesis with a Polymer-Based Magnetic Resonance Imaging Probe. [41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society](2014.7.13-16. Chicago)
- 田畑泰彦：研究・治療に分けて再生医療材料・機器ビジネスを考える。[持田製薬講演会](2014.7.28. 御殿場)
- 田畑泰彦：再生医療関連のニーズと周辺産業市場への期待。[大阪湾ベイエリア開発推進機構講演会](2014.8.11. 大阪)
- Tabata, Y.: Drug Delivery Systems for Regenerative Medicine. [Advances in Tissue Engineering 2014](2014.8.13-16. Houston)
- Tabata, Y.: Dual Release Technology of Bioactive Molecules for Regeneration Therapy. [The 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine](2014.8.27-29. Tao-Yuan) (招待講演)
- Tabata, Y.: Autophagy Modification by Intracellular Controlled Release of Rapamycin. [The 26th Annual Conference of the European Society for Biomaterials](2014.8.31-9.3. Liverpool)
- 田畑泰彦：高分子材料が支える再生医療の最前線 -再生治療と再生研究-。[14-3 ポリマーフロンティア 21](2014.9.5. 東京)
- 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 26 年度芦屋川カレッジ講演会](2014.9.10. 芦屋)
- 田畑泰彦：モノづくり技術によって再生研究と再生治療は実現する。[専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP Part VII](2014.9.18. 京都)

- Tabata, Y.: Biomaterials technology to realize regenerative medicine-regeneration therapy and regeneration research. 「MTERMS Meeting 2014」(2014.9.17-19 Kuala Lumpur) (招待講演)
- Tabata, Y.: Tissue regeneration technology to enhance in vivo cells recruitment. 「TERMIS-AP」(2014.9.24-27 Daegu)
- 田畑泰彦：再生医療で患者を救う. 「再生医療特別シンポジウム」(2014.9.28. 東京)
- 田畑泰彦：再生医療研究の最新動向と今後の展開. 「第一三共株式会社講演会」(2014.10.1. 東京)
- 田畑泰彦：Tissue engineering technology to realize regenerative therapy. 「2nd A3 foresight International Symposium on Nano-Biomaterials and Delivery Strategies in Regenerative Medicine for Intractable Diseases」(2014.10.8. 東京) (招待講演)
- 田畑泰彦：バイオマテリアルからみた再生治療. 「第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会」(2014.10.9-10 鹿児島)
- 田畑泰彦：ここまでできた！再生医療. 「第 14 回応現院文化講演会」(2014.10.21. 東京)
- 田畑泰彦：高分子材料からみた再生研究と再生治療. 「第 38 回高分子同友会総合講演会」(2014.10.29. 東京)
- 田畑泰彦：iPS 等再生医療関連産業育成パネル. 「京都産業コンソーシアム講演会」(2014.11.4. 京都)
- 田畑泰彦：先端医療におけるバイオマテリアルの重要な役割－DDS と再生医療－. 「奈良県立医科大学特別講義」(2014.11.5. 橿原)
- Tabata, Y.: Regenerative Medicine from the Viewpoint of Materials Science –Regenerative Research and Therapy－. 「25th 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science」(2014.11.9-12. 名古屋)
- 田畑泰彦：医療機器と再生医療. 「京都府立医科大学眼科講義」(2014.11.11. 京都)
- 田畑泰彦：糖応答性ハイドロゲルを用いた 3 次元培養基材の調製. 「第 72 回日本化学繊維研究所講演会」(2014.11.11. 京都)
- 田畑泰彦：バイオマテリアル技術からみた再生医療－再生治療と再生研究－. 「稲盛財団ワークショップ」(2014.11.12. 京都)
- 田畑泰彦：再生研究と再生治療の実現に必要なモノづくり技術. 「京都市リサーチパーク平成 26 年度解説講座」(2014.11.12. 京都)
- 田畑泰彦：「バイオマテリアル学会」座長(2014.11.17. 東京)
- Tabata, Y.: 再生医療のためのバイオマテリアル技術の必要性. 「第 6 回バイオマテリアル国際会議 BIOMAT 2014」(2014.11.19. キューバ)
- 田畑泰彦：発生再生学. 「日本歯科大学講義」(2014.11.25. 東京)
- 田畑泰彦：最先端医療を支えるバイオマテリアル. 「神戸大学大学院講義」(2014.11.27. 神戸)
- 田畑泰彦：材料技術からみる再生医療－再生治療と再生研究－. 「近畿化学協会機能性色素・エレクトロニクス部会東京地区合同公開講演会」(2014.12.2. 東京)
- 田畑泰彦：バイオ再生医療に向けた新たな疾患治療の細胞ソース. 「DDS 研究会」(2014.12.6. 東京)
- 田畑泰彦：モノづくり技術からみた先端医療の現状と今後の展望－再生治療と再生研究－. 「武田薬品工業株式会社講演会」(2014.12.11. 大阪)
- 田畑泰彦：再生医療を支える DDS 技術. 「日本 DDS 学会創立 30 周年記念シンポジウム」(2014.12.15-16. 東京)
- Tabata, Y.: 再生医療のためのナノバイオマテリアル・テクノロジー. 「13th Eurasia Conference on Chemical Science」(2014.12. インド)

山本雅哉, 戸田裕之, 有本晃佑, 田畑泰彦: 機能性ハイドロゲルによる生体機能再建. 「日本金属学会 2014 春期大会」(招待講演)(2014.3.22. 東京)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Bone tissue engineering based on functional hydrogels. 「University of Colorado, Boulder. Prof. Kristi Anseth's Laboratory Seminar」(2014.4.15. Boulder)

Yamamoto, M., Tabata, Y.: Bone tissue engineering based on controlled release of bioactive growth factors. 「Shriners Hospitals for Children, Research Division Seminar」(2014.4.22. Portland)

Yamamoto, M., Toda, H., Tabata Y.: Sandwich culture with bio-functional hydrogels as a three-dimensional culture model for enhanced osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. 「ISOMRM 2014」(招待講演)(2014.8.27. Taipei)

Yamamoto, M.: Vascular tissue engineering based on biomaterials. 「2014 CTCC Biomaterials Seminar Workshop」(招待講演)(2014.8.27. Taipei)

山本雅哉: 機能性ハイドロゲルを利用した再生治療・再生研究. 「再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座」(招待講演)(2014.12.2. 京都)

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)。

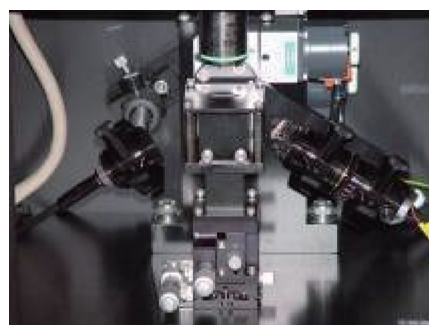


図1. 血液中のバイオマーカーを迅速・高感度計測するための装置。

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。

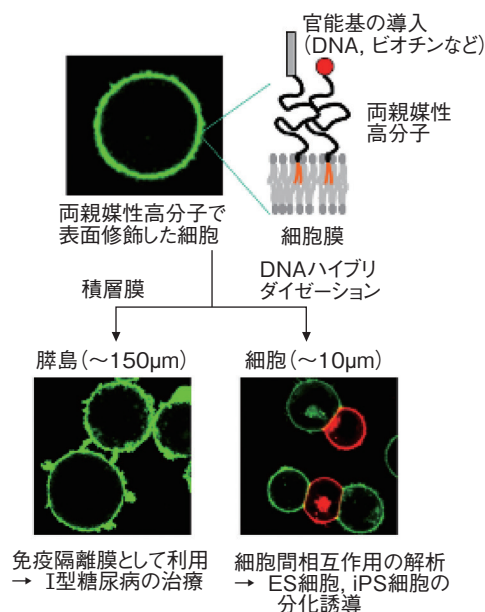


図2. 両親媒性高分子薄膜による細胞の被覆。

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。

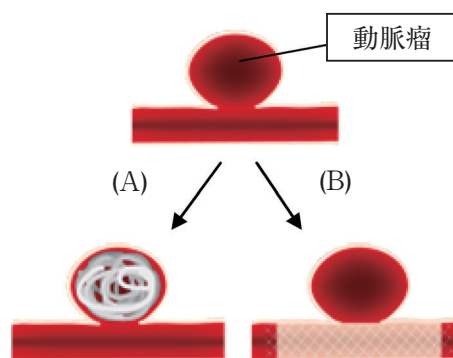
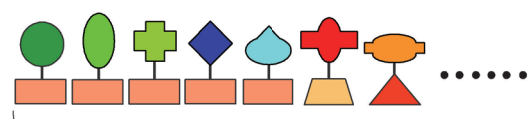


図3. (A)コイル塞栓術および(B)カバードステント留置術の模式図。

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。

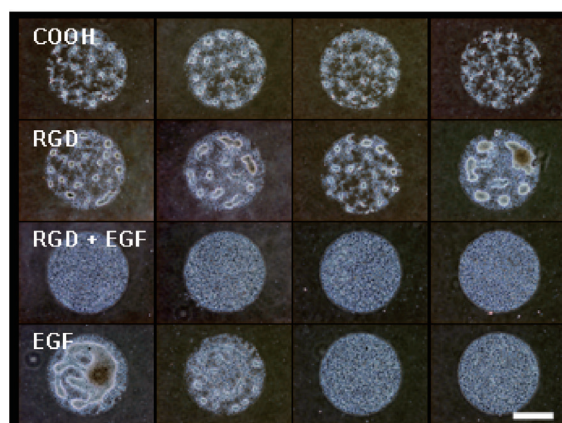


図5. 細胞チップによる蛋白質性材料のハイスループット機能アッセイの一例。

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 β cells are known to have a poor growth capacity. Islets containing β 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

Toda, M., Arima, Y., Takiguchi, H., Iwata, H. : Surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy apparatus with a convergent optical system for point-of-care testing. *Anal. Biochem.* 467 : 47-53 (2014)

Takemoto, N., Liu, X., Takii, K., Teramura, Y., Iwata, H. : Transplantation of co-aggregates of Sertoli cells and islet

- cells into liver without immunosuppression. Transplantation, **97**: 287-293 (2014)
- Takemoto, N., Konagaya, S., Kuwabara, R., Iwata, H.: Co-aggregates of regulatory T cells and islet cells allow long-term graft survival in liver without immunosuppression. Transplantation, in press.
- Deno, S., Takemoto, N., Iwata, H.: Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surfaces through DNA hybridization. Bioorg. Med. Chem., **22**: 350-357 (2014)
- Luan N. M. and H. Iwata H.: Long-Term allogeneic islet graft survival in prevascularized subcutaneous sites without immunosuppressive treatment. American Journal of Transplantation, **14**: 1533-1542 (2014)
- Konagaya, S., Iwata, H.: Microencapsulation of dopamine neurons derived from human induced pluripotent stem cells. Biochim Biophys Acta. **1850**: 22-32 (2014).
- Matsui, T., Arima, Y., Takemoto, N., Iwata, H. Cell patterning on polylactic acid through surface-tethered oligonucleotides. Acta Biomaterialia. **13**: 32-41 (2015).

3) 総 説

岩田博夫：バイオマテリアル研究とイノベーション. バイオマテリアル. 32(3), 1-2 (2014)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 有馬祐介, 岩田博夫：支持脂質二分子膜へ導入された単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質による細胞接着とその局在状態. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11.17-18. 東京)
- 小長谷周平, 岩田博夫：ヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経のマイクロカプセル化および凍結保存. 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3.4-6. 京都)
- 小長谷周平, 岩田博夫：ヒト iPS 細胞由来膵島細胞の大量調製. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11.17-18. 東京)
- Nakai R, Azuma T, Shigeno K, Wakatsuki M, Liu G, Takizawa O, Iwata H: Automated analysis of three-dimensional mandibular movement using multi-section dynamic MRI. Joint Annual Meeting ISMRM & ESMRMB 2014 (2014.5.10-16. Milan)
- Nakai R, Kitamura N, Iwata H.: Development and evaluation of labeled islet cells using iron oxide nanoparticles and DNA hybridization. Joint Annual Meeting ISMRM & ESMRMB 2014 (2014.5.10-16. Milan)
- 栗原令, 岩田博夫：bFGF 担持ハイドロゲルにより皮下に作製した免疫特異部位への膵島移植. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11.17-18. 東京)
- 小松光栄, 小長谷周平, 岩田博夫：アルギン酸 Ca²⁺ ゲルを用いたヒト iPS 細胞由来ドーパミン神経の大量調製, 日本バイオマテリアル学会第 9 回関西若手研究発表会 (2014.8.5. 京都)
- 松井利樹, 有馬祐介, 岩田博夫：オリゴヌクレオチド修飾によるポリ乳酸上への細胞パターンニング 日本バイオマテリアル学会 第 9 回関西若手研究発表会 (2014.8.5. 京都)
- 松井利樹, 有馬祐介, 竹本直紘, 岩田博夫：オリゴヌクレオチドを介したポリ乳酸上への細胞パターンニング. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11.17-18. 東京)
- 平居佑亮, 有馬祐介, 岩田博夫：スターチ表面への細胞接着の特異的制御, 第 60 回高分子研究発表会 (神戸) 60 周

年記念講演会(2014.7.24-25. 神戸)

松岡洋佑, 西村勇人, 児玉智信, 岩田博夫: 表面グラフトした内部線を用いた薬剤担持脳動脈瘤コイルの創製, 第60回高分子研究発表会(神戸)60周年記念講演会(2014.7.24-25. 神戸)

2) 講演・シンポジウム

Iwata H.: Introduction of antioxidant-loaded liposomes into endothelial cell surface through DNA hybridization. International Symposium on Nanomedicine Molecular science(2014.1.13-14. Nagoya)

Iwata H.: Long-term Allogeneic islet graft survival in pre-vascularized subcutaneous sites without immunosuppressive treatment. Translational Medical of Regenerative Medicine and Stem Cell(2014.6.28. Taiwan)(招待講演)

Iwata H.: Lecture: Cells patterned on polylactic acid through surface tethered oligonucleotides. The 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine(2014. 8. 28. Taiwan)(基調講演)

Luan N. M., Iwata H.: Preparation of immune-privileged site for all-islet transplantation by agarose-FGF2 complex. Immune Responses to Biosurfaces: Mechanisms and Therapeutic Interventions(2014.9.27-10.2. Greece)

岩田博夫: バイオマテリアルの研究と治療用デバイスの開発. 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ・日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会(2014.10.7. 仙台)(基調講演)

岩田博夫, 有馬祐介: 脂質二分子膜上への細胞接着. 日本化学繊維研究所第72回講演会(2014.11.11. 京都)

岩田博夫: 組織修復材料+細胞による糖尿病の治療. 京都市成長産業創造センター 一周年記念フォーラム - 今を支え未来を創るケミストリー(2014.11.27. 京都)(招待講演)

Arima, Y., Matsui, T., Iwata, H.: Cell patterning on polylactic acid through surface tethered oligonucleotides. The 2nd Japan-China Symposium on Nanomedicine(2014.5.16-17, Hiroshima)(招待講演)

Arima, Y., Iwata, H.: Cell adhesion to self-assembled monolayers and supported lipid bilayers for studying cell-substrate and cell-cell interaction. 7th World Congress on Preventive and Regenerative Medicine(7th WCPRM)(2014.11.5-7. Taiwan)(基調講演)

Arima, Y., Iwata, H.: Controlled cell attachment using oligonucleotide-poly(ethylene glycol)-lipid conjugates and their recruitment upon cell attachment. 8th International Symposium on Nanomedicine(2014.12.4-6, Matsuyama)(招待講演)

有馬祐介: モデル表面を用いた細胞-材料間および細胞-細胞間接着の解析. 2014 KIPS 若手高分子シンポジウム(2014.12.12. 京都)(招待講演)

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

客員教授 吉田 松生

Visiting Prof. Shosei Yoshida

【研究概要】

本分野では、再生現象の主役である組織幹細胞の実体とその挙動を詳らかにし、自己複製と分化を制御するメカニズムを解明することを目的としている。「組織幹細胞」の正体とその自己複製と分化の制御機構を知ることは、それらを適切に制御することを通して、再生医学の新たな展開に寄与することが期待される。具体的には、マウス精子幹細胞を研究対象としている。

【背景】

精巣に見られる精子形成は、造血系・消化管・皮膚などと共に、ほ乳類において最も活発に細胞がターンオーバーしている組織の一つであり、幹細胞が長期間の精子形成を支えている。「幹細胞ニッチ」が形態的に明確に同定出来る組織（ほ乳類腸管上皮やショウジョウバエ生殖腺など）と異なり、マウスの精細管（精巣の中に折り畳まれて入っている長い管で、精子形成はここで行われる）には、明瞭なニッチ構造が見られず、幹細胞は一カ所に集まることなく精細管内に散らばっている。このようなニッチは、「開いたニッチ；open niche あるいは facultative niche」と呼ばれるが、その分子的・細胞的実体や自己複製と分化の制御機構について明らかとなっていることは、上述の「閉じたニッチ；closed niche あるいは defined niche」に比べて大変限られている。

吉田らは、マウス精子形成幹細胞の性質とそれが精細管内で示す挙動を、生体内の蛍光標識細胞を連続観察するライブイメージング法(Yoshida et al., Science 2007), 条件的 Cre リコンビナーゼを用いたパルス標識法(Nakagawa et al., Dev. Cell 2007)などの実験系を用いて解析してきた。その中で、幹細胞として機能する「未分化型精原細胞」が GFR α 1 陽性(GFR α 1+)集団と Ngn3 陽性(Ngn3+)集団に分けられることを明らかにした。さらに、通常の定

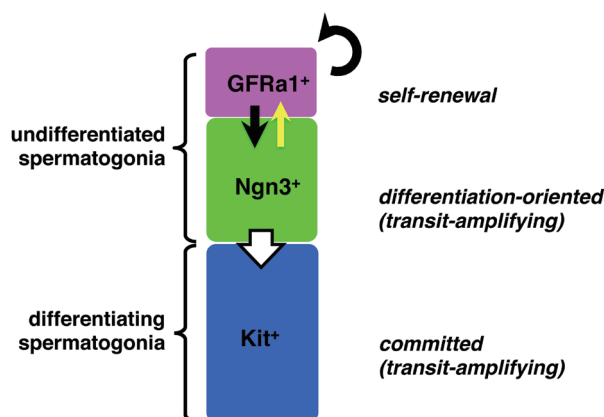


図1 マウス精子形成幹細胞システムの示す階層性。
Ngn3+細胞は分化に向かいながらも幹細胞の潜在能力を失っていない。

Figure 1 The functional hierarchy of spermatogonia.
Note that the Ngn3+ spermatogonia maintain the potential of self-renewal, while oriented toward differentiation.

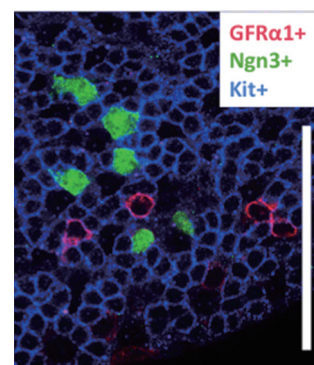


図2 精細管の「開いたニッチ」では、GFR α 1+ (マゼンタ), Ngn3+ (緑), Kit+ (青) 精原細胞がお互いに入り混じっている。スケールバーは 50 μ m。

(Ikami et al., Development 2015 より改変)

Figure 2 Intermingle of GFR α 1+ (magenta), Ngn3+ (green) and Kit+ (blue) spermatogonia in the “open niche” of seminiferous tubules.
Bars, 50 μ m.

(modified from Ikami et al., Development 2015)

常状態の精子形成においては、GFR α 1+細胞が幹細胞として機能して自己複製するとともに Ngn3+細胞を生み出すこと、Ngn3+細胞は殆ど自己複製することなく精子へと分化することが分かった(図1)。しかし Ngn3+細胞は、組織が障害を受けた後や宿主精細管に移植された後などに見られる再生過程において、幹細胞として機能する能力を維持している(Nakagawa et al., Dev. Cell 2007, Nakagawa et al., Science 2010)。精細管では、これら2タイプの未分化型精原細胞、更に Kit+の分化型精原細胞がお互いに入り混じって存在している(図2)。更に、GFR α 1+細胞は活発に動き回っていることがライブイメージングより示されている(Hara et al., 2014)。このように、真に幹細胞として働く GFR α 1+細胞、幹細胞の能力を持ちながら分化に向かっている Ngn3+細胞、不可逆的に分化した Kit+細胞が同じ組織環境に存在していると考えられる。このような状況で、幹細胞は決して枯渇することなく自己複製と分化のバランスを見事にとっているのである。これを実現するメカニズムは、幹細胞生物学の最大の謎の一つと言って良いだろう。

【2014年の成果】

2014年には「共に幹細胞としての能力を持ち、同じ open niche 環境にありながら、何故 GFR α 1+細胞は自己複製する幹細胞として挙動し、Ngn3+細胞は分化方向に向かった性質を示すのか？」という問題に取り組んだ(Ikami et al., Development 2015)。この時、レチノイン酸(RA)シグナルに注目した。RAは様々な組織に作用する生理活性物質である。精巣においても、未分化型精原細胞が分化型精原細胞へと分化するために必要なシグナルであることが知られている。様々な証拠から、精細管では周期的に RA 濃度が変化し、RA 濃度の上昇が分化型精原細胞を生み出すことが示唆されている。また、低分子の拡散性物質である RA は、精細管の open niche のなかで偏った分布を示さず、一様に分布することが示唆されている(Sugimoto et al., 2012)。従って、全ての未分化型精原細胞が同様に RA シグナルに暴露されているにも拘らず、決して全てが分化することなく必ず未分化な集団を残していると考えられる。

このメカニズムを明らかにするために、第一に、GFR α 1+細胞と Ngn3+細胞の RA に対する反応を、組織中の RA シグナルを人為的に操作出来るビタミン A 欠乏モデルを用いて検証した。その結果、GFR α 1+細胞は RA に顕著な反応を示さず、RA 欠乏状態でも Ngn3+細胞を生み出すことが分かった。一方、Ngn3+細胞は RA に強く反応し、短時間で Kit+細胞へ分化した。この RA に対する反応性(コンピテンス)の違いが、定常状態における GFR α 1+細胞と Ngn3+細胞の示す挙動の差の基盤となっていると考えられた。

次いで、RA に対するコンピテンスの違いを生む分子基盤を検討した。トランスクリプトーム解析を行ったところ、RA 受容に関わる遺伝子の多くは GFR α 1+細胞と Ngn3+細胞で類似の発現量を示した。しかし興味深いことに、RA 受容体の一つ RAR γ が Ngn3+細胞に顕著に偏った発現を示した。免疫染色の結果、Ngn3+細胞と RAR γ +細胞はほぼ一致した。RAR γ は、RA を結合すると同時に核内で DNA に結合して標的遺伝子の転写を制御する、RA シグナル受容の中核を担う因子である。次いで、GFR α 1+細胞に RAR γ を発現誘導するマウスを作成した。解析の結果、RAR γ を発現した GFR α 1+細胞は RA に反応して Kit+細胞へと分化した、この時、通常では決して見られない GFR α 1+かつ Kit+の細胞が多数見られたことから、Ngn3+状態を経ずに直接 Kit+へと分化したことが強く示唆された。

以上の結果は、未分化型精原細胞が、RA に対するコンピテンスを持たない GFR α 1+ (RAR γ -)細胞と持つ Ngn3+ (RAR γ +)細胞に分かれているため、同様に RA に暴露された時、Ngn3+細胞が分化する一方で GFR α 1+細胞は未分化に留まることを示唆する。RAR γ は精子形成幹細胞に分化出来る能力を与える「ライセンス因子」と言うことが出来る。以上のプロセスが周期的に繰り返すことで、精子形成の継続性が保証されていると考えられる(図3)。

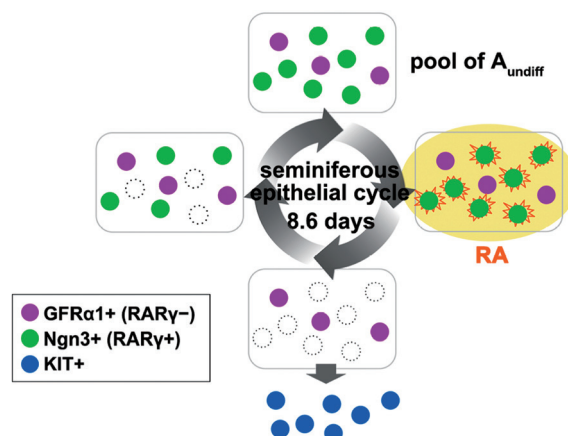


図3 精細管の「開いたニッチ」における未分化型精原細胞の維持と分化

周期的に生じる RA シグナルが来る前から、未分化型精原細胞は RA に対する分岐コンピテンスを持たない GFRα1+ 細胞と、持つ Ngn3+ とに分かれている。後者はコンピテンスのライセンス因子 RARγ を発現しており、その機能によって RA に応答して Kit+ 細胞へと分化する。GFRα1+ は RA 非依存的に Ngn3+ を作り出し、未分化型精原細胞は再び不均一になる。

(Ikami et al., Development 2015 より転載)

Figure 3 Maintenance and differentiation of undifferentiated spermatogonia in “open” niche of seminiferous tubules.

Before exposure to the periodically occurring RA signal, undifferentiated spermatogonia are already heterogeneous containing Ngn3+ and GFRα1+ populations, which possess and don't possess, respectively, the competence to differentiate in response to RA. Ngn3+ express RARγ which licenses these cells to differentiate to become Kit+. GFRα1+ cells give rise to Ngn3+ cells in an RA-independent manner, making the population of undifferentiated spermatogonia heterogeneous again.

(Adopted from Ikami et al., Development 2015)

【展望】

以上の結果示唆される幹細胞制御機構は、「閉じたニッチ」が組織の空間の不均一性によって自己複製と分化を制御するのと対照をなす。即ち、「開いたニッチ」では、空間的に一様に分化シグナルを受ける一方、幹細胞集団が分化シグナルに対するコンピテンスを不均一に持つことによって自己複製と分化のバランスを取ると言う、新しい概念を提唱する。マウス精子形成に留まらず、他の「開いたニッチ」でもこの戦略が共通して使われている可能性があるだろう。

Research outline

This department aims to reveal the cellular identity and behavior of tissue stem cells, the main players of regeneration, and to elucidate the mechanism regulating their self-renewal and differentiation. By revealing the nature of ‘tissue stem cells’, these studies are expected to contribute to the regenerative medicine and propose a novel strategy of the stem cell control. In particular, this department is focusing on the mouse sperm stem cells.

Background :

Spermatogenesis in the testis is one of the most actively turning-over tissues in mammals, as well as hemopoietic, gastrointestinal, and epithelial cells. A typical stem cell system is believed to support the long-lasting spermatogenesis that persists during the most of the longevity. In contrast to tissues supported by anatomically defined niches, including mammalian intestinal epithelium and *Drosophila* gonads, mouse seminiferous tubules (the long convoluted tubular structure in which spermatogenesis proceeds) do not harbor discrete niche structure. Further, stem cells do not cluster to particular regions but scattered over the tubules. Such an tissue environment is

termed “open, or facultative, niche”, whose cellular and molecular nature and regulation of self-renewal and differentiation remained largely to be elucidated, in contrast to the aforementioned “closed, or definitive, niche”.

We have been investigating the mouse spermatogenic stem cells’ characters and intratubular behavior, by means of intravital live imaging (Yoshida et al., Science 2007) and pulse-labeling using tamoxifen-dependent Cre (CreER) system (Nakagawa et al., Dev. Cell 2007). From these experiments, it has been revealed that “undifferentiated spermatogonia (A_{undiff})” that act as stem cells can be classified into $GFR\alpha1+$ and $Ngn3+$ subpopulations. In undisturbed, steady-state spermatogenesis, $GFR\alpha1+$ cells act as stem cells to maintain themselves and give rise to $Ngn3+$ cells, while most of the $Ngn3+$ cells differentiate without self-renewal (Figure 1). Interestingly, however, $Ngn3+$ cells retain the potential of self-renewal as stem cells that can be embodied during regeneration following tissue damage or transplantation into host seminiferous tubules (Nakagawa et al., Dev. Cell 2007, Nakagawa et al., Science 2010). What makes it difficult to investigate the stem cell regulation in seminiferous tubule is that these two types of A_{undiff} and $Kit+$ differentiating spermatogonia are intermingled on its basement membrane (Figure 2). Furthermore, live imaging revealed that $GFR\alpha1+$ spermatogonia actively migrate over this open niche area (Hara et al., Cell Stem Cell 2014).

To summarize, actually self-renewing $GFR\alpha1+$ cells, differentiation-primed $Ngn3+$ cells that retain self-renewing potential, and irreversibly-committed $Kit+$ cells appear to locate in the same environment. In such a situation, nevertheless, stem cells’ fates are nicely balanced, and they never deplete or accumulate abnormally. The underlying mechanism here is one of the biggest open questions of the stem cell biology.

Activity in 2014 :

In 2014, we challenged the question “Why $GFR\alpha1+$ and $Ngn3+$ spermatogonia exhibit different properties, although they appear to locate in the same microenvironment (While the former act as self-renewing stem cells, the latter are primed for differentiation)?” (Ikami et al., Development 2015). Here, we focused on the RA signal. RA is a bioactive molecule acting on various tissues. In the testis, RA plays crucial roles in the differentiation of A_{undiff} to $Kit+$ spermatogonia. Several evidence suggests that RA concentration in seminiferous tubules periodically changes, and that the rise of RA induces the genesis of differentiating spermatogonia. Further, RA, which is a diffusible low-molecular-weight substance, is suggested to spread uniformly in a particular segment of seminiferous tubules. These together indicate that, albeit that all the undifferentiated spermatogonia appear to be equally exposed to RA signal, a particular part of them remain undifferentiated.

To understand the mechanism underlying here, we first investigated the response of $GFR\alpha1+$ and $Ngn3+$ cells to RA, by use of Vitamin A-deficiency model in which the tissue RA signal level can be manipulated artificially. The results indicated that $GFR\alpha1+$ cells did not show apparent response to RA. Further, the production of $Ngn3+$ cells from $GFR\alpha1+$ cells did not depend on RA. In contrast, $Ngn3+$ cells showed a clear and quick response to RA and differentiated into being $Kit+$. Such distinct differentiation competence in response to RA explains the hierarchy between $GFR\alpha1+$ and $Ngn3+$ spermatogonia in steady-state spermatogenesis (Figure 1).

Then, we aimed to identify the molecular basis of such a heterogeneous differentiation competence. Transcriptome analysis showed that most of the genes involved in the RA reception were expressed at similar levels between $GFR\alpha1+$ and $Ngn3+$ cells. Interestingly, however, *rarg*, encoding $RAR\gamma$, one of the three RA receptors,

showed a highly preferential expression in Ngn3+ cells. Immunostaining demonstrated that Ngn3+ population was essentially the same with the RAR γ + population of A_{undiff}. RAR γ is a central player of RA reception, which binds RA, and also binds genomic DNA to regulate the transcription of the RA target genes. We then generated transgenic mice in which RAR γ could be expressed ectopically in GFR α 1+ spermatogonia. When RAR γ was induced, the GFR α 1+ cells become highly responsive to RA and differentiated to Kit+ spermatogonia. In this process, many GFR α 1/Kit double positive spermatogonia, which were barely observed in wild-type testes, were frequently observed, suggesting that RAR γ -expressing GFR α 1+ cells directly differentiate into Kit+ without experiencing the Ngn3+ state.

These results together suggest that the differential RAR γ expression provides the heterogeneous differentiation competence to RA among the population of A_{undiff}. This is the key why A_{undiff} showed heterogeneous response to the raise of tissue RA. In other words, RAR γ can be considered “the license factor” that provides the differentiation competence to the spermatogenic stem cells. As schematically shown in Figure 3, we propose that periodic repeat of these events supports the continuity of spermatogenesis.

Perspectives :

The mechanism of stem cell regulation proposed in this study makes a stark contrast to that observed in “closed niche”, which controls the self-renewal and differentiation on the basis of spatial unevenness. This study proposes a novel concept that, in an “open niche”, combination of spatially uniform distribution of differentiation-promoting signal and the heterogeneous competence of the stem cell population ensures the balanced self-renewal and differentiation. This strategy may also be used by other “open niche”-supported stem cell systems. This study also emphasizes the importance of the regulation of RAR γ which warrants future investigations.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Kanako Ikami, Moe Tokue, Ryo Sugimoto, Chiyo Noda, Satoru Kobayashi, Kenshiro Hara and Shosei Yoshida : Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis *Development* 142, 1-11 (2015)

Keisuke Ikegami, Yusuke Atsumi, Eriko Yorinaga, Hiroko Ono, Itaru Murayama, Yusuke Nakane, Wataru Ota, Natsumi Arai, Akinori Tega, Masayuki Iigo, Veerle M. Darras, Kazuyoshi Tsutsui, Yoshitaka Hayashi, Shosei Yoshida and Takashi Yoshimura : Low temperature-induced circulating triiodothyronine accelerates seasonal testicular regression. *Endocrinology* 156, 647-659 (2015)

Kenshiro Hara, Toshinori Nakagawa, Hideki Enomoto, Mikiko Suzuki, Masayuki Yamamoto, Benjamin D. Simons and Shosei Yoshida : Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell* 14, 658-672 (2014)

吉田松生：マウス精子幹細胞の動態からニッチの本質を考える「幹細胞ニッチが見えてきた！ Stem Cell を守り、育てる微小環境」実験医学 (株)羊土社 vol.32 No.16, 2567-2573 (2014)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Yu Kitadate, Ayumi Maruyama, Rie Ichikawa, Masatsugu Ema, Fumihiko Sugiyama, Satoru Takahashi, Takashi Nagasawa and Shosei Yoshida: Peritubular cells expressing CXCL12/FGF5 sustain spermatogonial stem cells in mice. *The 47th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network* (2014.5.28-31. 名古屋)

Kanako Ikami, Ryo Sugimoto, Moe Tokue and Shosei Yoshida: Differential Retinoic Acid Response of Stem Cell Subsets Maintains the Homeostatic Mouse Spermatogenesis. *The 47th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network* (2014.5.28-31. 名古屋)

Moe Tokue and Shosei Yoshida: Regulatory mechanism of germline "potential stem cells" in mice. *The 47th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network* (2014.5.28-31. 名古屋)

Kenshiro Hara, Hideki Enomoto, Benjamin Simons and Shosei Yoshida: Mouse spermatogenic stem cell dynamics during homeostasis. *The 47th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network* (2014.5.28-31. 名古屋)

Yoshiaki Nakamura, Kenshiro Hara, Benjamin Simons, and S. Yoshida: Stochastic behaviors of mouse spermatogenic stem cells after transplantation. *Gordon Research Conference on Mammalian Reproduction*, Colby-Sawyer College in New London (2104.8.8-15. NH, USA)

吉田松生: マウス精子幹細胞集団を支えるニッチの実体と機能の究明 認識と形成研究会 2014 (2014.9.14-15. 熊本)

Shosei Yoshida: Live imaging-based analysis of germline stem cell dynamics in the mouse testis. EMBL, Heidelberg (2014.10.9. Heidelberg, Germany)

Yu Kitadate, Ayumi Maruyama, and Shosei Yoshida: FGF5 is expressed in the vasculature-associated peritubular cells and controls the size of spermatogenic stem cell pool in the mouse testis. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells*, Cold Spring Harbor (2014.10.7-11. New York, USA)

Kanako Ikami, Ryo Sugimoto, Moe Tokue and Shosei Yoshida: Two subpopulations with different retinoic acid responsiveness support the stem cell function of mouse spermatogenesis. *Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine, EMBO Conference* (2014.10.9-12. Heidelberg, Germany)

Shosei Yoshida: Reconsidering the stem cell niche. 新学術領域研究「性差」若手シンポジウム (2014.12.9. 静岡)

2) 講演・シンポジウム

吉田松生: 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「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成 25 年度共同研究報告会 (2014.3.12 京都)

吉田松生: Sperm stem cell behavior in mouse testis. Workshop "Animal diversity and Developmental Biology II" International Mini-Symposium, "Eco-Devo-Evo" 京都大学理学研究科 (2014.3.22. 京都)

吉田松生: マウス精子幹細胞の動態とニッチの実体解明への挑戦新学術領域高演班・小林班合同シンポジウム「ニッチの謎を議論する: 免疫器官と生殖器官から見た微小環境の実体, 制御, 生理的意義」国際高等研究

所(2014.6.18-9. 京都)

Shosei Yoshida: A single-cell-resolution analysis of the sperm stem cell dynamics in the mouse testis. *The World Congress of Reproductive Biology 2014*, Edinburgh International Conference Centre, (2014.9.2-4. Edinburgh, UK)

Shosei Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells: their identity and dynamics. *KEY Forum: From Stem Cells to Organs*. (2014.9.4-5. 熊本)

Shosei Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells: their in vivo identity and dynamics. *EMBL Conference on Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine 2014* (2014.10.9-12. Heidelberg, Germany)

Shosei Yoshida: Dynamics of mouse sperm stem cells: How is the tissue homeostasis maintained? *The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan* (2014.11.25-27. 横浜)

吉田松生: ライブイメージングを基盤としたマウス精子幹細胞ダイナミクスの解明公開シンポジウム「The Frontire of the Reproductive Biology～生殖生命科学研究の最前線～」 「若手研究者の研究能力向上を実現する生殖生命科学に関する国際共同研究」(2014.11.28. 岡山)

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・接着の制御機構とそ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ジ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**：骨格筋が激しい運動や疾病などで損傷すると、骨格筋専用の幹細胞により効率よく再生される。この骨格筋幹細胞は、いつもは静止期にあるが再生が必要になると活性化され、増殖・分化し、骨格筋を新たに作り修復すると同時に再び幹細胞を産み出して次の再生に備える、という巧妙な仕組みを携えている。このような仕組みを応用して、難治性筋疾患である筋ジストロフィーなどにこの幹細胞を移植することで再生筋における機能タンパク質の発現を促す治療開発が期待されている。しかしこのような医学応用において、骨格筋幹細胞は試験管培養すると幹細胞としての能力(未分化性)を失い、再生筋への移植効率が著しく低下する、という問題を抱えている。我々は、幹細胞を用いた難治性筋疾患医療応用への問題解決を目指して、骨格筋幹細胞の成り立ちや基本的な性質を調べてきた。そして、この幹細胞が生後しばらくは増殖能が高いが、成体になると静止期への移行すること、マイクロRNA(mi-RNA)の産生に関わるDicerを骨格筋幹細胞特異的に欠損させると、静止期に入らず増殖し続けることから、静止期への移行は成長に伴い獲得されること、またそのプロセスにはmiRNAが関与することが分かった(図1)。

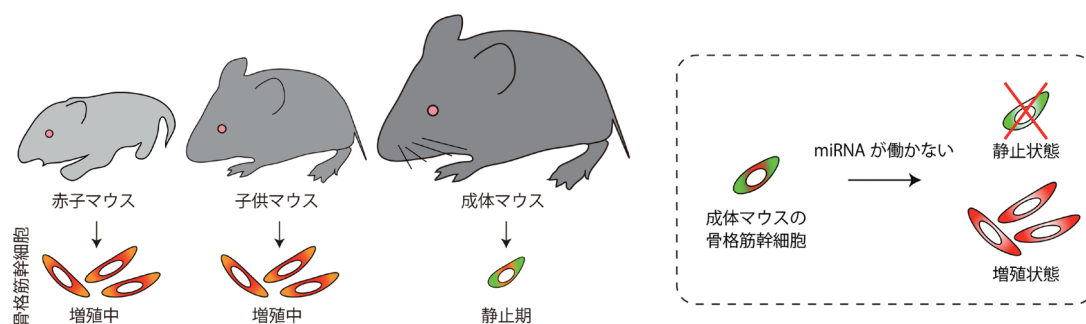


図1 成長に伴い静止期に入る骨格筋幹細胞(左)はmiRNAが働かないと増殖してしまう(右)

そこで、成長に伴い骨格筋幹細胞内で発現が高くなる miRNA に注目し、成体マウスの骨格筋幹細胞に高発現するマイクロ RNA195 とマイクロ RNA497(miR-195/497)が、細胞周期(増殖)に関わる遺伝子 *Ccnd* と *Cdc25* を抑制することにより、骨格筋幹細胞の静止期への移行を誘導することを見出した。さらにこの miR-195/497 を導入すると培養骨格筋幹細胞は試験管内でも未分化性を保つ、ということを明らかにした(図 2)。

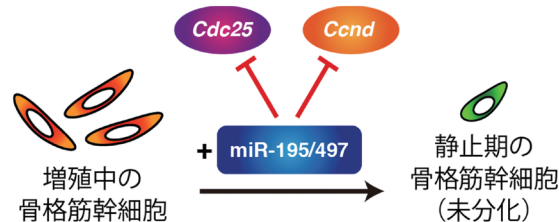


図 2 骨格筋幹細胞は、発現する miR-195/497 によって細胞周期制御と未分化な静止期へと誘導される

さらに骨格筋幹細胞を試験管培養する際に miR-195/497 を導入し、筋ジストロフィーモデルマウス下肢の骨格筋へ移植すると、再生筋への高い移植生着能を示した(通常の試験管培養では骨格筋幹細胞は未分化状態を維持できず、殆ど再生筋に寄与できない：図 3)。このように、miR-195/497 の導入により、試験管内での骨格筋幹細胞の増殖・分化を抑制して未分化性を維持することができ、移植された幹細胞の生着を向上させることができることを示した(佐藤貴彦の研究より；Sato T., *et al.*, *Nature Commun.*, 2014)。

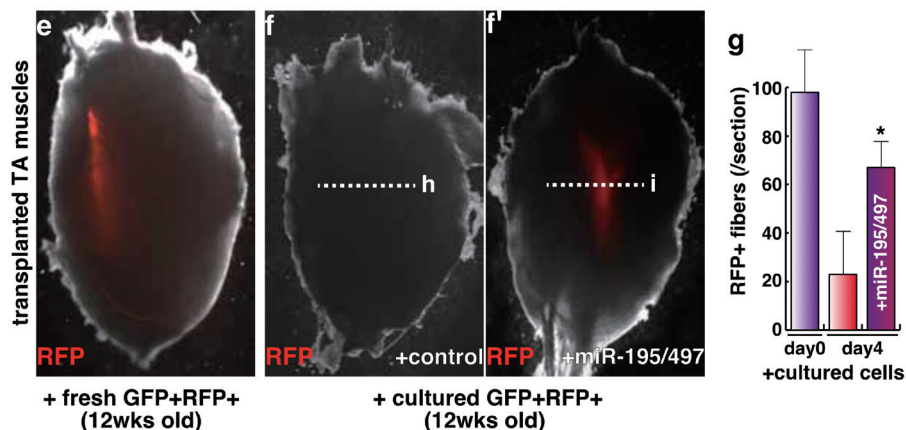


図 3 miR-195/497 導入によって培養下における骨格筋幹細胞の未分化性が維持され、移植の際の生着能を向上させることができる

(2) 筋再生における ADAM8 の役割：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(A disintegrin and metalloprotease)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を行っている。本年度は、ADAM8 に関する研究を紹介する。

前述のように、骨格筋には高い再生能がある。筋肉が損傷を受けると筋衛星細胞と呼ばれる筋特異的幹細胞が活性化され増殖、分化を経て新たな筋繊維が再生される。しかし筋組織が正常に修復されるためには筋衛星細胞の活性化に先行して炎症細胞の働きが不可欠である。炎症細胞は損傷筋細胞の除去に加えて筋衛星細胞の活性化に関与することが知られ、好中球および単球を除去したマウスでは筋再生が正常に起らないが、その機構には不明なところが多い。膜貫通型プロテアーゼ ADAM8 は、ゼブラフィッシュにおいては血球と血管内皮の接着解除を介して血液循環の開始に関わる(iida *et al.*, 2010)。一方 ADAM8 欠損マウスは発生段階での顕著な表現型は報告されておらず

生殖可能であるが、喘息などの炎症状態で発現が上昇し、炎症への関与が示唆されている。そこで西邨大吾は、骨格筋損傷に伴う炎症・筋再生過程における ADAM8 の役割と機能を探った。

まずカルジオトキシンによりマウスに筋損傷を与え、ADAM8 の発現の経時変化を調べたところ、ADAM8 の発現は損傷後 1 日後にピークに達した後に徐々に減少した。ADAM8 は、損傷後 1 日後の筋肉では CD45(+) の白血球成分特異的に強く発現し、それを表面抗原マーカーである Ly6G, Ly6C を用いてさらに分画すると、好中球成分である Ly6G(+)Ly6C(-) の集団で特に高い発現がみとめられた。次に ADAM8 の筋再生に対する寄与を評価するために、骨格筋の損傷・再生が繰り返起こるデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス(北里大学花岡和則博士より供与)と ADAM8 欠損マウス(Marburg 大学 J. Bartsch 博士より供与)を掛け合わせ、両方の遺伝子が欠損したマウスの骨格筋を解析したところ、このマウスでは壊死した筋繊維の顕著な残存と石灰化像の亢進が観察され、壊死細胞を取り囲む多数のマクロファージの残存が見られた。さらにカルジオトキシンによる筋損傷においても、ADAM8 欠損マウスは壊死繊維残存の亢進を示した。この際、損傷組織への単球の浸潤低下は見られなかった。

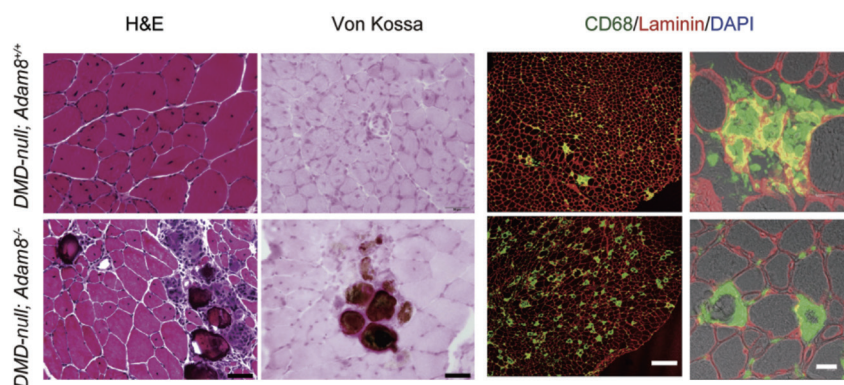


図 4 (左図)デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスは、筋繊維が壊れ易く、慢性的な筋再生状態となる。そのマウスと ADAM8 欠損マウスを交配したジストロフィン・ADAM8 ダブル欠損マウスでは、筋再生は起こるが(左図：中心核筋繊維が見える)、筋壊死像(黒っぽい染色像)が多数見られ、Von Kossa 染色陽性の石灰化が見られる。ダブル欠損マウスでは、傷害を受けた骨格筋を貪食するマクロファージ(CD68 陽性細胞(緑色)が、多数の残存壊死細胞を取り囲んでおり、慢性的な炎症像を呈する(右図)。

これに対し、筋損傷後の好中球の損傷組織への浸潤を免疫染色により調べると、ADAM8 欠損マウスの好中球は、損傷筋のまわりの間葉組織には野生型と同程度に浸潤するが、基底膜を越えて筋繊維内に侵入し大きな凝集塊を形成する割合が、野生型マウスの好中球に比べ顕著に減少していた(図 5)。好中球は、PSGL-1/セレクチン接着

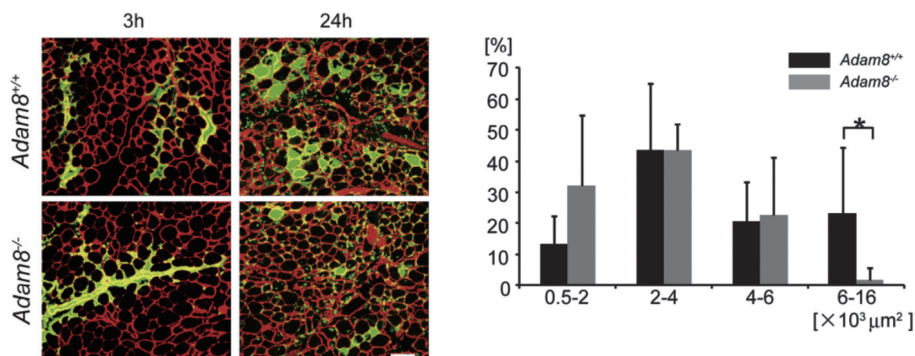


図 5 (左図) cardiotoxin により筋損傷を誘導すると、数時間(3 時間を表示)で好中球が骨格筋の間質に浸潤してくる。ADAM8 欠損マウスの好中球(Ly6 陽性、緑色)は、野生型と同程度に間質に浸潤する(骨格筋を囲むラミニン(赤色)の外側が間質である)。野生型では、そのあと間質から骨格筋内へと浸潤して大きなクラスターを作るが、ADAM8 が欠損していると骨格筋内へと浸潤が阻害される。(右図)筋繊維内へのクラスターの大きさを定量したもの。

による血管内でのローリングからインテグリンを介した血管との強い接着を誘導し間葉組織へと浸潤する。好中球等の炎症細胞で発現する接着分子 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) は細胞外ドメインの切断制御を受けることが知られており、ADAM8 はその切断制御に関与するプロテアーゼのひとつである。そこで、筋損傷後の好中球における PSGL-1 の発現を免疫染色によって調べると、好中球は間葉組織に浸潤後も PSGL-1 の細胞外ドメインを発現しているが、基底膜を越え筋繊維内侵入後の好中球ではその発現が消失することがわかり、好中球の損傷筋への侵入が PSGL-1 の細胞外ドメイン消失を伴うことが示唆された。さらにフローサイトメトリーによる解析において、野生型に比べ ADAM8 欠損マウスでは PSGL-1^{low} の好中球の割合が有意に低下しており、好中球の損傷筋組織内移動における PSGL-1 細胞外ドメイン消失への ADAM8 の寄与が示された。好中球除去により損傷筋の除去が不完全になることなどを考え合わせると、ADAM8 は、好中球の損傷筋繊維内への侵入を促進することにより、骨格筋再生に先行する損傷筋の効率的な除去に関与していると考えられる。

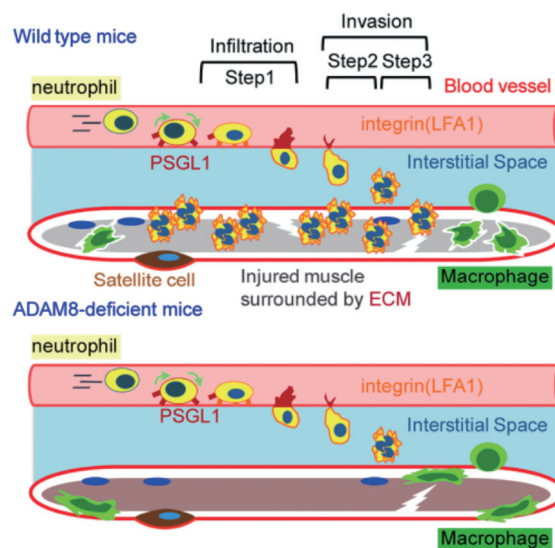


図 6 骨格筋再生における炎症細胞の挙動と ADAM8 の役割

筋再生における好中球の移動と ADAM8 の役割に関する作業仮説を図 6 に示した(西邨大吾の研究より；Nishimura et al., *Mechan. Dev.*, 2014)。

(3) その他の研究：我々は、発生・再生のダイナミクスを個体レベルで観察し、見られる現象を細胞・分子の言葉で理解したいと考えている。その目的で、小型魚類を用いた研究を行っている。

卵を体内で受精して成長した子供を出産する胎生は、哺乳類で最も普及している繁殖様式である。しかし哺乳類以外の脊椎動物においても、爬虫類、両生類、魚類など幅広い種で胎生種が分布している。彼らのほとんどは“胎盤”や“臍帯”を使用する哺乳類とは異なる胎生機構を獲得している。特に真骨魚類では、進化の過程で独立に複数の胎生種が出現したと考えられており、種ごとに異なるユニークな胎生機構を持つ。しかしこれまで、魚類の胎生機構の研究は形態や組織の記載が殆どであり、分子機構まで踏み込んだ解析は未開拓の状況であった。そこで飯田は、メキシコ原産のゲーデア科胎生魚ハイランドカープ(*Xenotoca eisen*)を用い、真骨魚類の胎生機構の解析を試みた。

ゲーデア科胎生魚の胎仔は肛門部に栄養リボン(trophotaenial placenta)という独自の構造物を持ち、母体から分泌された栄養分を吸収して成長すると考えられている。ハイランドカープについても、交尾後 2~4 週間の胎仔で

栄養リボンが観察された。だが、この栄養リボンは出産時には消失している(図7)。このことから、栄養リボンは出産に先立ち母体内で退縮を開始していることが予想された。組織の観察および細胞死マーカーを用いた染色により、栄養リボンではプログラム細胞死(apoptosis)が起こっていることが明らかになった(図8)。これは母体外で不要となる構造物をあらかじめ分解・吸収して、出産に備える機構だと捉えることができる。哺乳類を始めとする胎生動物において、このような退縮機構はこれまでに報告がなく、グーデア科の胎生で新奇に見出された現象である(飯田敦夫の研究より iida *et al.*, *Sci. Rep.*, 2014)。

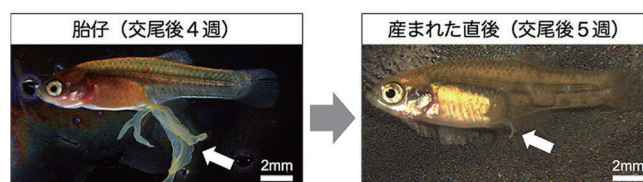


図7 グーデア科胎生魚の胎仔の肛門部から伸長している栄養リボンが出生直後の稚魚では著しく退縮している

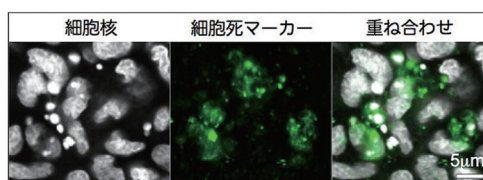


図8 退縮した栄養リボンでは細胞核の断片化やマーカー染色(Caspase3)など細胞死の特徴が見られる

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.

(1) miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells

Adult skeletal muscle stem cells (MuSCs), the major cellular source for skeletal muscle regeneration, are kept cell cycle arrested in muscle tissues except when they break the quiescence upon myofiber injury or under pathogenic condition such as Duchenne Muscular Dystrophy. Evidence suggests that embryonic skeletal muscle progenitor cells proliferate and differentiate to form myofibers and give rise to MuSCs as well, implying that their quiescence is acquired during development. Depletion of Dicer in adult MuSCs caused a transient increase in their proliferation, suggesting involvement of miRNAs in the MuSC quiescence. Screening of miRNAs of which expression was increased in MuSCs during juvenile to adult phase transition enabled us to identify miRNAs that convert juvenile proliferating MuSCs into those in quiescent states through targeting cell cycle genes. Quiescence-induced juvenile MuSCs with those miRNAs exhibited biochemical properties of quiescent adult MuSCs, increased and decreased expression of Pax7 and MyoD proteins, respectively. Transplanted MuSCs treated with those miRNAs contributed more efficiently to regenerating muscles of Dystrophin-deficient mice, suggesting potential utility of those miRNAs in the maintenance of quiescence and stemness of MuSCs in stem cell therapies of muscle diseases.

(2) Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration

Skeletal muscle regeneration requires processes different from developmental myogenesis. One important difference is inflammatory reactions prior to regenerative myogenesis, by which injured muscle fibers are eliminated to make new myotubes. In this study, we show that efficient elimination of injured muscle fibers during regeneration requires ADAM8, a member of a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family. Skeletal muscle of dystrophin-null mice, an animal model for Duchenne Muscular Dystrophy, deteriorates by the lack of ADAM8, which is characterized by increased area of muscle degeneration and increased number of necrotic and calcified muscle fibers. Upon cardiotoxin-induced skeletal muscle injury, neutrophils invade into muscle fibers through the basement membrane and cluster in wild type mice, but not in ADAM8-deficient mice although neutrophils of the latter infiltrate into interstitial tissues similarly to those of wild type mice. Neutrophils lose their adhesiveness to blood vessels after infiltration, which includes an ectodomain shedding of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) on their surface. Expression of PSGL-1 on the surface of neutrophils remain higher in ADAM8-deficient than in wild type mice. These results suggest that ADAM8 mediates a conversion of migratory behaviors of neutrophils by the removal of their adhesiveness to blood vessels after infiltration into injured muscle.

(3) Prenatal regression of the trophotaenial placenta in a viviparous fish, *Xenotoca eiseni*

The trophotaenial placenta is a branching, ribbon-like structure that extends from the perianal region of the embryo in viviparous teleost fishes belonging to the family Goodeidae. It is a hindgut-derived pseudoplacenta, which contributes to absorbing maternal nutrients during the prenatal stage. The trophotaeniae are known to reduce at birth; however, no previous study has evaluated the removal mechanisms. We report here the analysis of the trophotaeniae using the goodeid fish species *Xenotoca eiseni*. The *X. eiseni* trophotaenia consists of an epidermal cell layer, mesenchyme, vasculature, and circulating erythrocytes. The trophotaeniae had preliminarily regressed when the embryo was born. Immunohistochemistry indicated that caspase3-activated cells with fragmented nuclei are present in the regressed processes of the fry immediately after birth, but not in the vasculature and blood cells. This finding suggests that the trophotaenia is rapidly resorbed by apoptosis in the last phase of the pregnancy and that its circulatory pathway is maintained. Such prenatal regression of pseudoplacentae has not been reported in other viviparous vertebrates.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Nishimura D, Sakai H, Sato T, Sato F, Nishimura S, Toyama-Sorimachi N, Bartsch JW, Sehara-Fujisawa A.: Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration. *Mech Dev.* **135**: 58-67 (2014) *in press*

Iida A, Nishimaki T, Sehara-Fujisawa A.: Prenatal regression of the trophotaenial placenta in a viviparous fish, *Xenotoca eiseni*. *Sci. Rep.* **5**: 7855 (2014) *in press*

Wakatsuki, S., Araki, T., Sehara-Fujisawa, A.: Neuregulin-1/Glial Growth Factor stimulates Schwann Cell Migra-

tion by including the $\alpha 5 \beta 1$ integrin-ErbB2-Focal Adhesion Kinase Complex Formation. *Genes to Cells*. **19** (1): 66-77 (2014)

Sato, T., Yamamoto, T., Sehara-Fujisawa, A.: miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat. Commun.* **5**: 4597 (2014)

2) 書 籍

Iida A: Primitive erythroblast cell autonomously regulates the timing of blood circulation onset via a control of adherence to endothelium. [New Principles in Developmental Processes] (Kondo H & Kuroiwa A 共編, Springer, 東京) 85-96 (2014)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

Aosa Kamezaki, Fuminori Sato, Kazuya Tsumagari, Atsuko Sehara-Fujisawa: Temporal and Spatial Regulation of Neuregulin-ErbB signaling in the developing nervous system (神経系の発達における Neuregulin-ErbB signaling の時空間的制御機構). 47th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (第 47 回日本発生生物学会) (2014.5.28-29. 名古屋)

佐藤文規, Choi Minyong, 栗木麻央, 内田智子, 川上浩一, 瀬原淳子: ゼブラフィッシュの骨格筋に対する微重力環境の影響. 新学術領域「ゲノム支援」2014 年度 拡大班会議 (2014.8.20. 神戸)

飯田敦夫: 真胎生魚ハイランドカープの胎仔発生. 日本動物学会第 85 回仙台大会 (2014.9.11. 仙台)

Iida A, Nishimaki T, Sehara-Fujisawa A: Prenatal regression of trophoblastic placenta is regulated by apoptosis in a viviparous teleost fish, *Xenotoca eiseni*. The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2014.9.20. 東京)

Tokumasu Y, Iida A, Sehara-Fujisawa A: Exploration of ADAM12 in zebrafish: expression analysis and generation of knockout fish. The 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (2014.9.20. 東京)

Tokumasu Y, Iida A, Sehara-Fujisawa A: Exploration of ADAM12 in zebrafish: expression analysis and generation of knockout fish. 第 7 回 Evo-Devo 青年の会 (2014.10.11. 三島)

2) 講演・シンポジウム

Atsuko Sehara-Fujisawa: Roles of ADAM19 in cranial nerve development, 「The 6th Asia Oceania Zebrafish Conference」(招待講演) (2014.1.22. 香港)

瀬原淳子: 神経細胞分化を制御する脳内細胞外環境. 第 14 回日本抗加齢医学会総会 (2014.6.8. 大阪)

Tomomi Sato, Fuminori Sato, Aosa Kamezaki, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa (講演者): Exploring Mechanisms of Neurogenesis in the Developing Brain with Live Zebrafish Embryos. 第 66 回日本細胞生物学会大会 (2014.6.12. 奈良)

瀬原淳子: 生命誕生の設計図を解く, 「第 7 回ライフサイエンスセミナー: 研究者と語ろう」(招待講演) (2014.8.19. 豊中)

Atsuko Sehara-Fujisawa: Mechanisms of Skeletal Muscle Regeneration, 「The 2nd Kyoto University & National Taiwan University Symposium 2014-Biology Session」(2014.9.1. 京都)

Atsuko Sehara-Fujisawa: Novel Molecular and Cellular Mechanisms of Skeletal Muscle Regeneration, 「熊本医学・生物科学国際シンポジウム「幹細胞制御と臓器再建」」(招待講演)(2014.9.5. 熊本)

Atsuko Sehara-Fujisawa: Mechanisms of Skeletal Muscle Regeneration, 「Symposium “Genomic and epigenomic insights into vertebrate regeneration, development and evolution - development and evolution - *Xenopus* and fish as models”」(招待講演)(2014.11.5. Chile)

瀬原淳子: 細胞たちの「自分探し」～臓器ができる仕組みを探る～, 「楽しむ科学教室 第89回講演」(招待講演)(2014.12.13. 米子)

飯田敦夫: 胎生魚 *Xenotoca eiseni* の初期発生と交尾事情, 「大阪大学大学院理学研究科セミナー」(招待講演)(2014.6.20. 豊中)

再生免疫学分野 Department of Immunology

分野主任 教授 河本 宏
Prof. Hiroshi Kawamoto

【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

免疫チェックポイント阻害抗体が一部のがんに奏効しているという事実は、そのようながん患者の体内にがん細胞に得意的な細胞傷害性T細胞(CTL)が存在していることを示している。またCTLを利用した養子免疫療法やT細胞レセプター遺伝子導入療法も一定の成績を上げている。ただ、これらのCTLそのものを利用した治療法は、基本的には自家移植の系で使われ、他家移植はほとんど行われてこなかった。その主な理由は、ポリクローナルなT細胞集団は一定の割合で他人の細胞に反応するT細胞(アロ反応性T細胞)を含んでおり、それらがGVHDを引き起こす恐れがあるからである。その問題点を解決し「T細胞の他家移植を可能にする方法」として、我々は「iPS細胞技術を用いたクローニング」という戦略を進めている。

具体的には、まず抗原特異的T細胞からiPS細胞を作製する(T-iPS細胞)。T-iPS細胞には元のT細胞が有していた再構成されたT細胞レセプター遺伝子の構造が受け継がれている。従って、T-iPS細胞からT細胞を分化誘導すると、元のT細胞と同じ特異性をもつモノクローナルなCTLをつくることができる。iPS細胞段階でほぼ無限に増やせるので、新鮮なCTLを必要なだけ作製できる。こうして再生したT細胞を患者に戻すという方法である。このアイデアに基づいてメラノーマ抗原 MART-1 の再生に成功している (Cell Stem Cell, 2013)。

この系はモノクローナルなT細胞を扱うので、他家移植の系で使える。我々は、あるがん抗原に対していろいろなHLA型のT-iPS細胞バンクを準備して、その中から患者のHLA型と適合する細胞を選び出して利用するという構想を進めている(図1)。この場合、T-iPS細胞は必ずしも患者から作る必要はなく、健康人ドナーから作ってもよい。HLAハプロタイプホモの人をドナーとすれば汎用性の高い細胞をつくることができる。製剤としては、再生T細胞を凍結保存したものを解凍して用いる。このような戦略により、自家移植に比べてコストを抑えることができ、迅速に使用して、また品質保証もしやすくなる。さらに、他家移植なので移入細胞はいずれは拒絶されるであろうから、「移入細胞のがん化」を怖れる必要がなくなる。現在いろいろな抗原について検討しているところであるが、最初の臨床応用例としては、現時点では主にWT1抗原を標的とした戦略を軸に進めている。

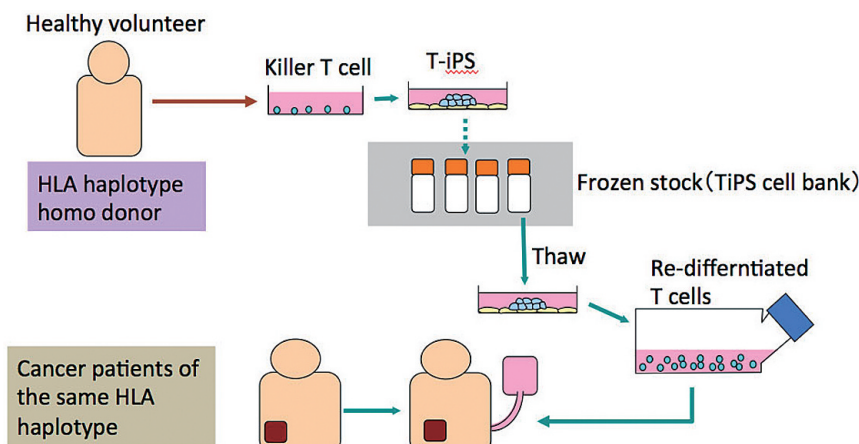


図1 T-iPS細胞バンク構想

HLA ハプロタイプホモの健康人からあるがん抗原に特異的なキラー T 細胞を誘導し、そのキラー T 細胞から T-iPS 細胞を作製する。その T-iPS 細胞から再生した T 細胞の有効性を確認した上で、T-iPS 細胞を次々と凍結保存して T-iPS 細胞バンクを確立する。同じ HLA ハプロタイプホモあるいはヘテロの人が同じがん抗原を発現するがんになった場合に、即座に使えることになる。こうすれば、患者ごとに iPS 細胞をつくるというコストを減らせる。効果があることが分かっているので品質が保証されるという利点もある。また、速やかに治療が受けられるのも利点である。さらに、他人の T 細胞はいずれは拒絶されるであろうから、「移入した細胞ががん化する」という危険性も回避できるという利点もある。

Fig. 1 T-iPSC bank strategy

Firstly, we produce iPS cells from CTLs of healthy volunteer that are specific for a certain tumor antigen, and CTLs with the same antigen specificity can be regenerated in vitro from these iPS cells. These regenerated T cells will be evaluated regarding efficacy to kill cancer cells, and safety. When the regenerated cells pass these tests, then T-iPS cells are frozen and stored as "T-iPSC bank". When HLA-matched patient appears, then regenerated T cell produced from T-iPSC bank cells would be given to the patient. By taking this strategy, efficacy would be ensured and cost will be reduced. It would also be a merit that patient can immediately undergo the therapy. Another important merit is that the transferred cells will be eventually rejected by recipient immune system base on minor antigens, making patient free from tumorigenicity of transferred cells.

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⁺ 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. We are now developing a new strategy in which we can clone and expend tumor-antigen specific cytotoxic T cells (CTLs) in the patient. We have already succeeded in regeneration of CTLs specific for the melanoma epitope MART-1 originally derived from a melanoma patient by using the iPSC technology, demonstrating that the idea actually works well (Vizcardo et al, Cell Stem Cell, 2013).

We further thought that this strategy can be applied in the allogeneic settings. In this strategy, CTLs specific for certain tumor antigen are firstly collected from healthy volunteers (Figure 1). HLA-haplotype-homo donors are

preferable, since regenerated T cells can be used in not only haplotype-homo but also hetero recipients. Once T-iPSC are produced, they are stored as “T-iPSC bank”. These will be used when HLA matched patient develop cancer expressing the same tumor antigen.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Chojnowski JL, **Masuda K**, Trau HA, Thomas K, Capecchi M, Manley NR. Multiple roles for HOXA3 in regulating thymus and parathyroid differentiation and morphogenesis in mouse. Development 141 : 3697-3708, 2014.
- Stinke FC, Yu S, Zhou X, Yang W, Zhou B, **Kawamoto H**, Zhu J, Tan K, Xue HH. TCF-1 and LEF-1 act upstream of Th-POK to promote the CD4(+) T cell fate and interact with Runx3 to silence Cd4 in CD8(+) T cells. Nat. Immunol.14 : 646 : 656, 2014.
- Hoshii T1, Kasada A, Hatakeyama T, Ohtani M, Tadokoro Y, Naka K, Ikenoue T, Ikawa T, **Kawamoto H**, Fehling HJ, Araki K, Yamamura K, Matsuda S, Hirao A. Loss of mTOR complex 1 induces developmental blockage in early T-lymphopoiesis and eradicates T-cell acute lymphoblastic leukemia cells.Proc Natl Acad Sci USA. 111 : 3805-3810, 2014.
-

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 増田喬子 : Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology : A novel strategy of cancer immunotherapy The Third Bizan Immunology Symposium (2014.2.13. 徳島)
- 増田喬子 : Regeneration of antigen specific T cells using iPS cell technology ThymOz7 (2014.4.4. Australia)
- 増田喬子 : 多能前駆細胞から B 前駆細胞へ至る過程にミエロイド-B 前駆細胞段階が存在する 新学術領域「細胞運命制御」若手の会 (2014.4.18. 静岡)

2) 講演・シンポジウム

- 増田喬子 : 胸腺周囲の間葉系細胞に発現する Hoxa3 は胸腺の胸部への移住に必須である 第 33 回日本胸腺研究会シンポジウム (2014.2.8. 東京)
- 河本 宏 : iPS 細胞技術を用いて再生した T 細胞によるがんの免疫療法の開発 第 2 回医工連携人材育成セミナー (2014.2.1. 京都)
- 河本 宏 : 初期化による抗原特異的 T 細胞のクローニングとバンク化構想 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3.6. 京都)
- 河本 宏 : Conversion of T cells to B cells by the inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression. ThymOz7 (2014.4.4. Australia)
- 河本 宏 : iPS 細胞によるがん特異的キラー T 細胞の再生 第 102 回日本泌尿器科学会総会 (2014.4.24. 兵庫)
- 河本 宏 : 造血幹細胞から T 細胞へ至る系列決定の過程 - iPS 細胞技術を用いた抗原特異的 T 細胞の再生 - 第

15 回基礎血液懇話会(2014.4.25. 愛知)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん特異的キラー T 細胞の再生－がんの免疫細胞療法の革新的戦略－ 第 48 回品川セミナー(2014.5.2. 東京)

河本 宏：iPS 細胞を用いた細胞療法への展開 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会(2014.5.16. 奈良)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 第 35 回癌免疫外科研究会(2014.5.23. 大阪)

河本 宏：Regeneration of Antigen Specific T Cells Using the iPSC Technology：A novel Strategy for Cancer Immunotherapy Translational Medical of Regenerative Medicine and Stem Cell(2014.6.28. Taiwan)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いた抗原特異的 T 細胞の再生 第 35 回日本炎症・再生医学会(2014.7.3. 沖縄)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 第 9 回 Meet the Hematologists(2014.7.5. 京都)

河本 宏：T 細胞の発生と再生－分化過程の解明と再生 T 細胞を用いた免疫細胞療法の開発－ 第 14 回血液フォーラム 21(2014.7.26. 京都)

河本 宏：Regeneration of antigen specific T cells using the iPSC technology：A novel strategy for cancer immunotherapy 第 18 回日本がん免疫学会総会(2014.7.31. 愛媛)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的 T 細胞の再生 第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会(2014.8.31. 東京)

河本 宏：Regeneration of antigen specific T cells using the iPSC technology：A novel strategy for cancer immunotherapy 第 2 回京都大学－国立台湾大学共催シンポジウム(2014.9.1. 京都)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的 T 細胞の再生 第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会(2014.9.6. 京都)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いた抗原特異的 T 細胞のクローニングとがんの免疫細胞療法への応用 第 42 回日本臨床免疫学会総会(2014.9.25. 東京)

河本 宏：Regeneration of antigen specific T cells using the iPSC technology：A novel strategy for cancer immunotherapy 免疫療法研究者とサノフィ研究開発部門責任者との座談会(2014.10.9. 東京)

河本 宏：iPS 細胞技術を利用して再生した T 細胞によるがんの免疫細胞療法 第 16 回再生医療の実用化に関するニーズ発表会(2014.10.10. 兵庫)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いた抗原特異的 T 細胞のクローニングとがんの免疫細胞療法への応用 第 4 回医工薬産学公連携支援シンポジウム「革新的技術が織り成すライフイノベーションの創生」(2014.11.12. 京都)

河本 宏：がん免疫療法の基礎研究：最新の知見－他家移植の系で使える「T 細胞製剤」の開発に向けて－ 第 4 回がん新薬開発合同シンポジウム(2014.11.28. 東京)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いた抗原特異的 T 細胞の再生－薬物スクリーニング用の再生 T 細胞の開発－ 日本動物実験代替法学会第 27 回大会(2014.12.7. 横浜)

河本 宏：Molecular mechanisms for production and maintenance of the T cell lineage 第 43 回日本免疫学会学術集会シンポジウム(2014.12.12. 京都)

河本 宏：iPS 細胞技術を用いて再生した T 細胞のがん治療への応用－「T 細胞の他家移植」の道を拓く－ 秋田県泌尿器科集談会(2014.12.13. 秋田)

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げたいと考えている。

2014年は、実際の臨床応用に用いる細胞製造プロトコルを確立した(図1)。臨床応用のためには106オーダーの細胞を準備する必要があるため、効率の良い大量培養法を開発しなければならない。さらに、安全かつ効率的な移植を行うためには、増殖性のある細胞を取り除きドパミン神経細胞の純度をできるかぎり高めなければならない。最初の目的のために、我々は大阪大学の関口清俊先生と共同でラミニンフラグメントを用いたfeeder-free接着培養法を開発した。ヒトiPS細胞をラミニンフラグメント511-E8上でBMP阻害因子、Activin阻害因子を加えて高密度接着培養すると極めて効率よく神経系の細胞へと分化した。この方法によって、これまで培養皿あたりのドパミン神経細胞誘導効率が20倍以上になり、数十枚の96穴プレートを用いて行っていた培養が数枚の6-wellプレートで行えるようになった。

また、これまでの研究から脳内で効率よく成熟ドパミン神経細胞の生着を得るには、やや未分化なドパミン神経前駆細胞を移植することがよいと知られていた。しかし、ドパミン神経前駆細胞の特異的表面マーカーは知られていない。我々はfloor plateマーカーであるCORINに着目し、KAN研究所の尾野雄一先生と共同で抗CORIN抗体を用いたセルソーティング法を開発した。分化誘導法を工夫して効率よく中脳腹側細胞を誘導し、CORINによるソーティングと組み合わせることによってドパミン神経前駆細胞の割合を80%にまで引き上げることに成功した。この細胞をラットパーキンソン病モデルに移植すると、16週間の観察で異常回転運動が改善した。その後の免疫組織染色で高密度のドパミン神経細胞生着が確認され、さらに増殖細胞がみられないことが明らかになった。ソーティングをしない細胞を移植した場合と比べて、移植片のサイズは有意に小さいが、有意に多くのドパミン神経細胞が生着していた。すなわち、CORIN陽性細胞をソーティングで選別することによって、より安全かつより効率的な細胞移植ができると期待される。

これらの成果に基づいて、現在はこの製造方法で作製したドパミン神経前駆細胞をカンクイザルのパーキンソン病モデルに移植し、効果と安全性を確認している。また免疫不全ラット脳に対する移植によって移植細胞の造腫瘍性も検討しており、これらの実験でよい結果がえられれば臨床研究の申請を行おうと考えている。

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. We also generated DA neurons from human iPSCs, and confirmed that these cells could survive as long as 6 months in the monkey brain. We have also demonstrated that the autologous transplantation of iPSC-derived neural cells is beneficial for minimizing the immune response in the brain compared to allogeneic grafts. These results support the idea that human ESCs/iPSCs can be used as a source for cell replacement therapy of PD. However, ESC/iPSC-derived donor cells may inevitably contain tumorigenic or inappropriate cells. Therefore, as a next step for the clinical application of human iPSCs to treat Parkinson's disease, we are seeking a protocol to produce appropriate donor cells in terms of both safety and efficacy of the transplantation.

In 2014, we have reported a protocol for clinical application of human iPSC-derived DA neuron progenitors. We demonstrated that human iPSC-derived DA progenitor cells can be efficiently isolated by cell sorting using a floor plate marker, CORIN. We induced DA neurons using scalable culture conditions on human laminin fragment (511-E8), and the sorted CORIN⁺ cells expressed the midbrain DA progenitor markers, FOXA2 and LMX1A. When transplanted into 6-OHDA-lesioned rats, the CORIN⁺ cells survived and differentiated into midbrain DA neurons *in vivo*, resulting in significant improvement of the motor behavior, without tumor formation. In particular, the CORIN⁺ cells in a NURR1⁺ cell-dominant stage exhibited the best survival and function as DA neurons. Our method is a favorable strategy in terms of scalability, safety and efficiency, and may be advantageous for clinical application.

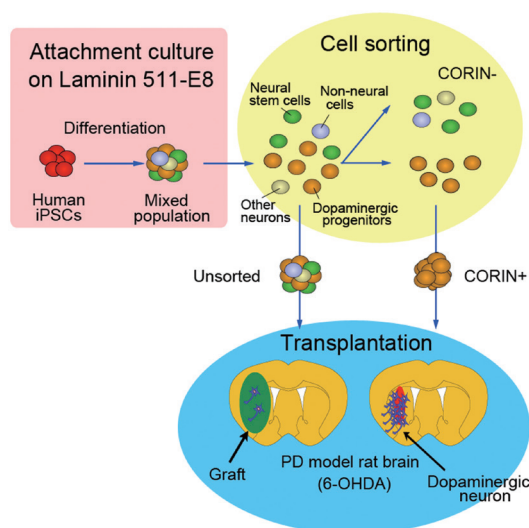


図 1：臨床応用に向けたドパミン神経前駆細胞作製プロトコール。

ラミニンフラグメント 511-E8 上で高密度接着培養をすることにより、神経誘導が効率よく大量にできるようになった。また中脳腹側細胞誘導法と CORIN によるセルソーティングを組み合わせることにより、ドパミン神経前駆細胞の純度を 80% 以上に高めることが可能になった。

Fig. 1 Protocol for the clinical application of human iPSCs to treat Parkinson's disease.

we have developed a method for 1) scalable DA neuron induction on human laminin fragment and 2) sorting DA progenitor cells using a floor plate marker. The sorting of DA progenitor cells is favorable in terms of both safety and efficacy of the transplantation.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Doi D, Samata B, Katsukawa M, Kikuchi T, Morizane A, Ono Y, Sekiguchi K, Nakagawa M, Parmar M, Takahashi J.
Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for
Successful Transplantation. Stem Cell Rep **2**(3): 337-350(2014)

Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, Morizane A, Doi D, Takahashi J, Nishizawa
M, Yoshida Y, Toyoda T, Osafune K, Sekiguchi K, Yamanaka S. A novel efficient feeder-free culture system
for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Sci Rep **4**: 3594(2014)

2) 著 書

森実飛鳥：再生医療の展望，「脳神経外科診療プラクティス②脳神経外科の基本手技」(橋本信夫監修，飯原弘二編
集，文光堂，東京)169-172(2014)

森実飛鳥，高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病の治療「先端医療シリーズ 45 臨床医のための最新脳神経
外科」(橋本信夫，寺本明，小川彰，嘉山孝正編集，先端医療技術研究所，東京)1-4(2014)

3) 総 説

森実飛鳥，高橋 淳：Parkinson 病に対する神経細胞移植，診断と治療 **102**(10)，1549-54(2014)

森実飛鳥，高橋 淳：パーキンソン病の新しい治療－再生医療を中心に－，老年精神医学雑誌 **25**(11)，1235-40，
(2014)

土井大輔，高橋 淳：II. 本年の動向 3)パーキンソン病に対する細胞移植治療，Annual Review 神経 2014(中外
医学社，東京)79-85(2014)

土井大輔，高橋 淳：パーキンソン病の Visual View 22. パーキンソン病と iPS 細胞技術，Frontiers in Parkinson
Disease **Vol.7**, No.2(22-26)2014

土井大輔，高橋 淳：中枢神経系における iPS 細胞の臨床応用～パーキンソン病を中心に～，脳神経外科速報 **Vol.24**，
No.7 2014.7

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細胞移植治療，難病と在宅ケア，**第 20 巻**，第 8
号，49-52(2014)

菊地哲広，高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療，Geriatric Medicine **52**(3)，269-272, 2014

元野 誠，高橋 淳：パーキンソン病に対する再生医療，最新医学 **vol.69**, 119(639)-129(649)，(2014)

元野 誠，高橋 淳：パーキンソン病に対するドパミン神経細胞移植－パーキンソン病の臨床研究に向けて－医学
のあゆみ **vol.250**(13)，1201-1205(2014)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 第 15 回兵庫パーキンソン病治療研究会(2014.3.1. 神戸)

- 高橋 淳：パーキンソン病に対する iPS 細胞由来神経細胞移植 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞由来神経細胞移植における免疫原性 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.6. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 全国難病センター研究会第 21 回研究大会(2014.3.9. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 8 回高知県パーキンソン病と不随意運動研究会(2014.5.7. 高知)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療の開発研究 第 21 回 HAB 研究機構学術年会(2014.5.16. 東京)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 34 回日本脳神経外科コンgres 総会(2014.5.17. 大阪)
- Jun Takahashi: Steps towards stem cell therapy for Parkinson's disease 第 55 回日本神経学会学術大会(2014.5.22. 福岡)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療の開発研究 平成 26 年度十全医学会学術集会(2014.6.24. 金沢)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 4 回神奈川運動障害疾患研究会(2014.6.27. 横浜)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 35 回日本炎症・再生医学会(2014.7.1. 沖縄)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 33 回分子病理学研究会宮城蔵王シンポジウム(2014.7.26. 宮城)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 10 回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会(2014.7.31. 京都)
- Jun Takahashi: Step towards stem cell therapy for Parkinson's disease The 12th Meeting of The Asian-Pacific Society for Neurochemistry(2014.8.25. Kaohsiung)
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する iPS 細胞移植治療 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会(2014.9.5. 京都)
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する幹細胞移植治療 第 37 回日本神経科学大会(2014.9.11. 横浜)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療に向けた開発研究 第 30 回ブレイン・ファンクション・イメージング・カンファレンス(2014.9.20 神戸)
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する iPS 細胞移植治療 日本脳神経外科学会第 73 回学術総会(2014.10.11. 東京)
- 高橋 淳：パーキンソン病, 脳血管障害に対する iPS 細胞由来神経細胞移植による 機能再生治療法の開発 再生医療実現拠点ネットワーク事業 第 36 回 PM 会議(2014.10.24. 東京)
- 高橋 淳：パーキンソン病に対する iPS 細胞移植 第 12 回新潟パーキンソン病治療研究会(2014.11.7. 新潟)
- Jun Takahashi: Challenges towards stem cell therapy for Parkinson's disease The 5th meeting of Asian Cellular Therapy Organization(2014.11.10. Osaka)
- 高橋 淳：パーキンソン病, 脳血管障害に対する iPS 細胞由来神経細胞移植による機能再生治療法の開発 再生医療実現拠点ネットワークプログラム～技術開発個別課題のネットワーク創出のための研究発表会～(2014.11.11. 東京)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療に向けて 第 14 回山梨再生・移植研究会(2014.11.26. 山梨)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いてパーキンソン病治療に向けて 第 15 回モーターコンプリケーション研究会(2014.12.13. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療に向けて 第 9 回岐阜脳神経研究会(2014.12.15. 岐阜)
- 森実飛鳥：iPS 細胞由来ドパミン神経を用いた神経細胞の自家移植 第 9 回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会(2014.1.22. 京都)
- 森実飛鳥：iPS 細胞を用いた脳内細胞移植治療における免疫原性の検討 第 12 回日本組織適合性学会近畿地方会(2014.2.1. 大阪)

森実飛鳥：iPS細胞由来ドーパミン神経移植の臨床応用へのストラテジー～自家移植およびHLA適合移植の可能性～ 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.5. 京都)

土井大輔：ヒトiPS細胞由来ドーパミン神経前駆細胞の脳内移植 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.5. 京都)

西村周泰, 高橋 淳：iPS細胞由来ドーパミン神経細胞を用いた細胞移植に対する生着向上因子の同定 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.5. 京都)

西村周泰, 高橋 淳：iPS細胞由来ドーパミン神経移植に対する生着向上因子の同定に向けた創薬アプローチ 第87回日本薬理学会年会(2014.3.19. 仙台)

Kaneyasu Nishimur, Jun Takahashi: Identification of new secreted factor from the efficient-engrafted brain environments as new maturation factor for grafted iPSC-derived dopaminergic neurons. CiRA Retreat 2014 (2014.4.19. Shiga)

西村周泰, 高橋 淳：トランスシナプストレーサーを用いた中脳ドーパミン神経支配を受ける線条体神経の組織学的特性解析 第37回日本神経科学大会(2014.9.12. 横浜)

菊地哲広：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13回日本再生医療学会総会(2014.3.4. 京都)

Tetsuhiro Kikuchi, Asuka Morizane, Daisuke Doi and Jun Takahashi: iPSCs derived from Parkinson's disease patients differentiate into functional dopaminergic neurons CiRA Retreat 2014(2014.4.19. Shiga)

Makoto Motono, Yoshihiko Ioroi, Jun Takahashi: Development of cortical neuron differentiation from pluripotent stem cells using small molecules CiRA Retreat 2014(2014.4.19. Shiga)

Makoto Motono, Yoshihiko Ioroi Jun Takahashi: Development of cortical neuron differentiation from pluripotent stem cells using small molecules ISSCR 12th Annual Meeting(2014.6.18. Vancouver)

佐俣文平：免疫不全ラットを用いたパーキンソン病モデル作製と機能評価 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.4. 京都)

Samata Bumpei, Daisuke Doi, Kaneyasu Nishimura, Jun Takahashi: Analysis of mouse ES cell-derived ventral midbrain cells to identify a specific cell surface marker ISSCR 12th Annual Meeting(2014.6.18. Vancouver)

宮脇良文：ゾニサミド全身投与による、ドーパミン神経前駆細胞移植後の成熟ドーパミン神経細胞生着促進 第13回日本再生医療学会総会(2014.3.5. 京都)

2) 講演・シンポジウム

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 東日本地域本部トレリーフ特別講演会「TORERIEF Special Seminar in TOKYO」(2014.1.18. 東京)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療の開発研究 第88回 PONS CLUB(2014.1.23. 京都)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 第5回先進医療フォーラム(2014.1.25. 東京)

高橋 淳：iPS細胞から見える未来に向けて 平成25年度近畿地域放射線技師会学術大会(2014.2.16. 京都)

高橋 淳：ES, iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 平成25年度 再生医療サポートビジネス懇話会(2014.2.21. 京都)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 公益社団法人 日本介護福祉士養成施設協会 2013年度近畿ブロック教員研修会(2014.2.22. 京都)

高橋 淳：iPS細胞を用いたパーキンソン病治療 静岡県難病連 結成30周年記念医療講演会(2014.3.2. 静岡)

- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 日本 SMO 協会 10 周年記念講演会(2014.3.12. 東京)
- 高橋 淳：iPS 細胞由来 DA 細胞を用いたパーキンソン病の治療に向けた安全性について 先導的創造科学技術開発費「多能性幹細胞由来移植細胞の安全性評価研究」第 8 回運営会議(2014.3.13. 神戸)
- Jun Takahashi: Steps towards stem cell therapy for Parkinson's disease Stem Cell Society Seminar(2014.3.20. Singapore)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 右京医師会学術講演会(2014.3.29. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を応用した臨床研究への視点 第 3 回アジア製薬団体連携会議(2014.4.11. 東京)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 全国パーキンソン病友の会 茨城県支部総会(2014.4.20. 茨城)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 パーキンソン病 Web 講演会(2014.4.23. 東京)
- Jun Takahashi: Challenges towards stem cell therapy for Parkinson's disease The 7th Kyoto-Seoul-Taipei Neuro-surgical Friendship Meeting(2014.5.10. Kyoto)
- 高橋 淳：iPS 細胞研究とパーキンソン病治療 東京都パーキンソン病友の会総会(2014.5.25. 東京)
- 高橋 淳：iPS 細胞技術は再生医療にどう生かされるか 第 164 回全国講演大会(2014.5.31. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 筑波大学「医学セミナー」(2014.6.10. つくば)
- 高橋 淳：iPS 細胞の臨床応用にむけて 第 35 回多摩パーキンソン病懇話会(2014.7.10. 東京)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 福岡労災保険指定病院協会学術講演会(2014.7.22. 福岡)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 第 57 回神経内科懇話会(2014.8.2 東京)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 臓器再生を目指した再生医療開発の最前線(2014.8.8. 東京)
- Jun Takahashi: Cell replacement therapy for Parkinson's disease using iPS cells The mini-symposium(2014.8.22. Taipei)
- 高橋 淳：iPS 細胞でパーキンソン病に挑む 第 34 回日本脳神経外科コンgres市民公開講座(2014.8.31. 福岡)
- 高橋 淳：iPS 細胞を使って脳をつくる 専門家との直接意見交換シンポジウム in KRP Part VII(2014.9.18. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 パーキンソン病の基礎と臨床(2014.9.19. 大阪)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 平成 26 年度難病講演会(2014.10.4. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 全国パーキンソン病友の会富山県支部 医療講演(2014.10.19. 富山)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療に向けて 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 平成 26 年度第 5 回勉強会(2014.11.14. 京都)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いてパーキンソン病治療に向けて パーキンソン病フォーラム(2014.12.4. 姫路)
- 高橋 淳：iPS 細胞を用いたパーキンソン病治療 難病医療講演会(2014.12.7. 京都)
- Asuka Morizane, Daisuke Doi, Tetsuhiro Kikuchi, Keisuke Okita, Akitsu Hotta, Toshiyuki Kawasaki, Hirotaka Onoe, Takashi Shiina, Shinya Yamanaka, Jun Takahashi: The 7th Takeda Science Foundation Symposium PharmaSciences(2014.1.16. Osaka)
- 森実飛鳥：合成ラミニンを使用した iPS 細胞からのドーパミン神経分化誘導 大阪大学 蛋白質研究所セミナー「多能性幹細胞研究の最前線～培養技術から解析技術まで～」(2014.3.28. 大阪)
- Asuka Morizane, Daisuke Doi, Tetsuhiro Kikuchi and Jun Takahashi: Autologous transplantation of iPS cell-derived neurons to the brain of non-human primate The 12th Stem Cell Research Symposium(2014.5.30.

Fukuoka)

森実飛鳥：iPS細胞を用いたPD治療の可能性 パーキンソン病座談会(パーキンソン病診断と治療の最前線)
(2014.7.25. 京都)

森実飛鳥：パーキンソン病に対する細胞移植 J-CAN 2014 シヌクレイノパチーの病態・治療研究最前線
(2014.8.23. 東京)

Asuka Morizane：Immune response in the brain after transplantation of the neural cells derived from induced pluripotent stem cells The 10th Annual Meeting of Korean Society of Stem Cell Research (2014.8.28 Seoul)

森実飛鳥：パーキンソン病に対する細胞移植治療～iPS細胞の臨床応用～「細胞を創る」研究会 7.0 (2014.11.14. 東京)

森実飛鳥：パーキンソン病に対するiPS細胞を用いた細胞移植治療 第32回日本こども病院神経外科医会
(2014.11.22. 静岡)

Daisuke Doi, Asuka Morizane, Jun Takahashi：Sorting and Transplantation of Dopaminergic Progenitor Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells The 7th Takeda Science Foundation Symposium PharmaSciences
(2014.1.16. Osaka)

Kaneyasu Nishimura, Jun Takahashi：Isolation of Secreted Factors to Support Survival of the Grafted iPSC-derived Dopaminergic Neurons. The 7th Takeda Science Foundation Symposium PharmaSciences (2014.1.16 Osaka)

Kaneyasu Nishimura, Jun Takahashi：Experimental Approach to Identify the Endogenous Supportive Factor for the Grafted iPSC-Derived Dopaminergic Neurons CDB symposium 2014 (2014.3.10-12. Kobe)

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. 間葉系幹細胞に関する研究

1) 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、培地成分の影響を解析している。

2) 再生医療への応用

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(図 1)。平成 20 年 2 月 5 日に第一例の治療を

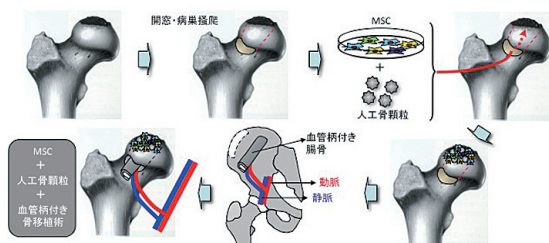


図 1 間葉系幹細胞を用いた大腿骨頭壊死症に対する細胞治療の概要。

Figure 1 Schematic presentation of the cell therapy using mesenchymal stem cells for idiopathic osteonecrosis of femoral head.

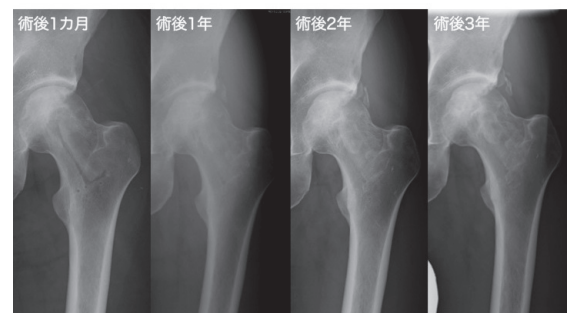


図 2 細胞治療後の画像経過。代表例での細胞治療後各時点での股関節 X 線像。

Figure 2 Radiographic results of cell therapy of the representative case. X-ray findings of hip joint at each time point after the cell therapy were shown.

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(図 2 及び図 3)、その結果に基づいて、先進医療への申請を計画している。

2. 多能性幹細胞を用いた間葉系組織の研究

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、無限の増殖能を有する多能性幹細胞であり様々な医学・医療応用が探索されている。我々は京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)の一員として、iPS 細胞から誘導した間葉系細胞に関する研究を行っている。これまでに、現在は下記の研究を行っている。

1) 肉腫起源細胞の探索

肉腫とは間葉系組織に発生する悪性腫瘍であり、臨床及び病理学的に極めて多様な腫瘍の集団である。近年の遺伝子解析技術の進歩により、それぞれの腫瘍において腫瘍発生に関連する遺伝子異常が明らかにされてきているが、起源細胞に関しては、その多くにおいて不明である。同一の遺伝子変異を有している腫瘍でも、それぞれの増殖を規定するシグナル伝達系や分化能が異なることが明らかにされつつあり、これらは細胞起源の相違に起因している可能性が伺える。我々は腫瘍特異的な遺伝子変異が薬剤誘導型発現ベクターを用いて導入された多能性幹細胞を用いて細胞起源を解明し、個々の腫瘍の多様性の成因を明らかにすることで、個別化治療の開発に寄与する情報を得ることを目指している。

2) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と創薬

遺伝性の筋骨格系疾患の多くは、病態が不明で有効な治療法が確立されていない。特定の個人から樹立できるという iPS 細胞の特質を利用して、近年、疾患罹患患者由来の iPS 細胞を樹立して病態解明から創薬に向けた研究が展開されている。我々も現在、複数の難治性骨軟骨疾患に対して、疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究を行っている。

3) iPS 細胞由来分化間葉系細胞を用いた再生医療

iPS 細胞由来の分化細胞を用いた再生医療に関しては、iPS 細胞研究所の妻木研究室との共同研究として軟骨病態に対する細胞治療の開発を目指している。

3. 細胞を用いない再生医療に関する研究

上記の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。プロスタグランディン 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

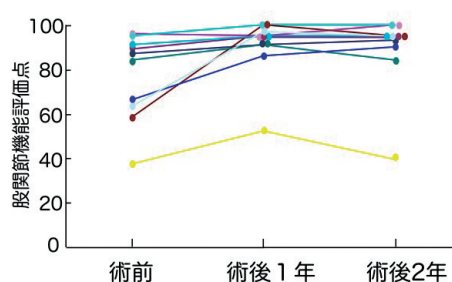


図3 細胞治療後の臨床成績の経過。各症例での治療前、治療後1年、及び治療後2年時の股関節機能評価点の推移。

Figure 3 Clinical results of cell therapy. The hip joint scores of five cases were shown at before, 1-year after, and 2-year after the operation.

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 MMP13 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 the molecular level and to develop new therapeutic modalities by understanding physiological growth and differentiation of mesenchymal cells. Following projects are currently undertaken.

1. Researches on 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. We have been working on following issues related to MSCs.

1) Regulation of growth and differentiation potential of mesenchymal stem cells

Many fundamental features of MSCs 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 the effects of nutrients in the culture media.

2) 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) (Fig. 1). After the examination of ethical committee of Kyoto University and MHLW, our protocol 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 (Fig. 2 and Fi. 3). Based on the data of this intermediate evaluation, we are going to submit this method as an advanced therapy for MHLW.

2. Researches on pluripotent stem cells

Human iPS cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007, are pluripotent stem cells with unlimited growth potential, and promising materials to apply for a variety of medical fields. We have

been engaging the research related to iPS cells as members in the Center for iPS Research and Application, Kyoto University. So far we found that the clonal difference of iPS cells were derived from the difference donor using genetically matched iPS cells established from different tissues of same donors. Followings are current on-going projects.

1) Investigation for the cell-of-origin in sarcomas using pluripotent stem cells

Sarcomas are malignant tumors developed in mesenchymal tissues and highly heterogeneous from the standpoint of clinical and pathological views. Recent advancement of genetic analyses disclosed tumor-specific driver mutations in sarcomas, although the cell-of-origin of sarcomas are still unknown in most cases. 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.

2) Approaches for intractable musculoskeletal diseases using disease-specific iPS cells

In most of cases, the pathophysiology in hereditary musculoskeletal diseases are still to be investigated and no effective treatments are available. Using the advantage that iPS cells can be established from particular individuals, a number of disease-specific iPS cells have been established and used to understand the disease and discover the drugs. We are also employing this approach for several intractable bone and cartilage diseases.

3) Regenerative medicine using iPS cell-derived mesenchymal cells

Cell therapy using iPS cell-derived differentiated cells is one of the important applications of iPS cells, and we are aiming to develop cell therapy for cartilage diseases in collaboration with Prof. Tsumaki in CiRA.

3. 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* ex-

periments 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.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Matsumoto Y, Ikeya M, Hino K, Horigome K, Fukuta M, Watanabe M, Nagata S, Yamamoto T, Otsuka T, Toguchida J. New protocol to optimize iPS cells for genome analysis of fibrodysplasia ossificans progressive. Stem Cells. In press.
- Kobayashi K, Toguchida J, Karin M, Kato T Jr. IKK β in postnatal perichondrium remotely controls endochondral ossification of the growth plate through downregulation of MCP-5. Cell Death Differ. In press.
- Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. Arthritis Rheumatol. 2015 ; 67(1): 302-14.
- Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. PLOS ONE. 2014 ; 9(12): e112291.
- Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamel W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A and Saya H. IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. Cancer Res. 2014 ; 74(22): 6531-41.
- Totoki Y, Yoshida A, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Ogura K, Yoshida A, Fujiwara T, Arai Y, Toguchida J, Tsuda H, Miyano S, Kawai A, Shibata T. Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. Genome Res. 2014 ; 24(9): 1411-20.
- Takahashi R, Nagayama S, Furu M, Kajita Y, Jin Y, Kato T, Imoto S, Sakai Y, Toguchida J. AFAP1L1, a novel associating partner with vinculin, modulates cellular morphology and motility, and promotes the progression of colorectal cancers. Cancer Med. 2014 ; 3(4): 759-74.
- Asada N, Kato I, Daifu T, Umeda K, Hiramatsu H, Okamoto T, Toguchida J, Yamawaki S, Yoshikawa K, Adachi S, Heike T, Watanabe K. Good Response to Chemotherapy Spares Irradiation for Extrarenal Rhabdoid Tumor Conferring Better Activities of Daily Living. J Pediatr Hematol Oncol. 2015 ; 37(1): e57-9.
- Aoyama T, Goto K, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ueda M, Kasai Y, Maekawa T, Tada H, Teramukai S, Nakamura T, Toguchida J. An exploratory clinical trial for idiopathic osteonecrosis of femoral head by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts. Tissue Eng Part B Rev.

2014; 20(4): 233-42.

Husain SR, Ohya Y, Toguchida J, Puri RK. Current Status of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. Tissue Eng Part B Rev. 2014; 20(3): 189.

戸口田淳也. 骨・軟部腫瘍のゲノム解析と治療への応用 卒後研修講座. 整形外科 2014; 65(5): 459-462

戸口田淳也. iPS細胞を用いた運動器再生医療の最先端. CLINICAL CALCIUM 2014; 24(4): 125-130.

戸口田淳也, 福田誠, 池谷真. 間葉系幹細胞を巡る最近の進歩について. 細胞工学 2014; 33(12): 1282-12870

2) 著書

戸口田淳也 骨腫瘍各論 第23章 骨腫瘍 第IV編 整形外科疾患総論 標準整形外科学 第12版 2014年2月15日発行 医学書院 東京 松野丈夫, 中村利孝 総編集 馬場久敏, 井樋栄二, 吉川秀樹, 津村弘編集

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

日根野翔, 玉置さくら, 金 永輝, 川井 章, 吉田朗彦, 岡本 健, 松田秀一, 加藤友久, 戸口田淳也. 滑膜肉腫の上皮様構造形成機構におけるエピジェネティック制御. 第38回近畿肉腫研究会(2014.2.1. 名古屋)

戸口田淳也, 松本佳久, 福田 誠, 池谷 真, 西小森隆太. 疾患特異的 iPS細胞を活用した難治性骨軟骨疾患研究. 第13回日本再生医療学会(2014.3.5. 京都)

平雄一郎, 岡本 健, 中山富貴, 仲俣岳晴, 松田秀一, 戸口田淳也. 当科における後腹膜腔原発軟部肉腫の治療成績. 第122回中部日本整形外科災害外科学会(2014.4.12. 岡山)

戸口田淳也. iPS細胞を活用した整形外科疾患の病態解明から創薬. 第87回日本整形外科学会学術総会(2014.5.23. 神戸)

戸口田淳也, 玉置さくら, 福田 誠, 池谷 真, 加藤友久, 岡本 健, 松田秀一. 新規治療戦略の開発をめざした肉腫起源細胞の探索. 第87回日本整形外科学会学術総会(2014.5.23. 神戸)

Matsuomoto Y, Ikeya M, Fukuta M, Hsiao E, Hayashi Y, Asaka I, Otsuka T, Conklin BR, Toguchida J. Identification of gene sets dysregulated by mutant ACVR1 gene causing a rare intractable disease, fibrodysplasia ossificans progressiva. 第12回 ISSCR(2014.6.18. Vancouver)

Toguchida J, Aoyama T, Goto K, Kakinoki R, Kasai Y, Maekawa T, Tada H, Teramukai S, Nakamura T, Matsuda S. An exploratory clinical trial for idiopathic osteonecrosis of femoral head by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts. 第12回 ISSCR(2014.6.19. Vancouver)

Watanabe M, Yokoyama K, Ikeya M, Yamamoto R, Tanaka T, Nishikomori R, Saito M, Umeda K, Heike T, Sato T, Toguchida J. Identification of biomarkers for the arthropathy in CINCA syndrome using chondrocytes derived from patient-specific iPSCs. 第12回 ISSCR(2014.6.20. Vancouver)

横山宏司, 西小森隆太, 納富誠司郎, 田中孝之, 斉藤 潤, 梅田雄嗣, 池谷 真, 小原 収, 中畑龍俊, 戸口田淳也, 平家俊男. 患者由来 iPS細胞を用いた CINCA 症候群における関節症病態の解析. 第35回日本炎症・再生学会(2014.7.1. 沖縄)

西田佳弘, 川井 章, 戸口田淳也, 生越章, 下瀬省二, 大野貴敏, 平賀博明, 森岡秀夫, 播谷勝三, 山本哲二, 土屋弘行. 横紋筋肉腫の診断と治療: 横紋筋肉腫外科治療に関するアンケート調査より. 第 47 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2014.7.17. 大阪)

日根野翔, 玉置さくら, 金 永輝, 川井 章, 吉田朗彦, 岡本 健, 松田秀一, 加藤友久, 戸口田淳也. 滑膜肉腫の上皮様構造形成におけるエピゲノム制御の関与. 第 47 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2014.7.17. 大阪)

玉置さくら, 福田 誠, 早川和男, 加藤友久, 戸口田淳也. 細胞背景は滑膜肉腫特異的融合タンパク SS18-SSX のエピジェネティック制御において重要である. 第 47 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2014.7.17. 大阪)

川村真吾, 大野貴敏, 秋山治彦, 山田泰広, 戸口田淳也, 山田一成. EWS/ATF1 誘導性肉腫細胞株由来 iPS 細胞作製の試み. 第 47 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会(2014.7.18. 大阪)

戸口田淳也, 金 永輝, 松永一仁, 岡本 健, 松田秀一. 骨・軟部腫瘍の遺伝子解析-最近の進歩-. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会(2014.10.9. 鹿児島)

松本佳久, 池谷 真, 福田 誠, 永田早苗, 浅香 勲, 大塚隆信, 戸口田淳也. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解析. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会(2014.10.10. 鹿児島)

池谷 真, 松本佳久, 横山宏司, 福田 誠, 那須 輝, 浅香 勲, 大塚隆信, 戸口田淳也. iPS 細胞を用いた難治性骨軟骨疾患への取り組み. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会(2014.10.10. 鹿児島)

河村真吾, 大野貴敏, 秋山治彦, 山田一成, 戸口田淳也, 山田泰広. EWS/ATF1 誘導性肉腫細胞株由来 iPS 細胞を用いた発がん研究. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会(2014.10.10. 鹿児島)

Hineno S, Tamaki S, Yonghui J, Kawai A, Yoshida A, Okamoto T, Matsuda S, Kato T, Toguchida J. Involvement of epigenetic mechanism in the formation of epithelial structure of synovial sarcoma. 第 19 回 CTOS(2014.10.17. Berlin)

Tamaki S, Fukuta M, Hayakawa K, Jin Y, Hineno S, Ikeya M, Kato T, Toguchida J. Cellular Context Is Important Factor For The Ss18-Ssx-Mediated Transcriptional Regulation. 第 19 回 CTOS(2014.10.17. Berlin)

玉置さくら, 福田 誠, 早川和男, 金 永輝, 日根野翔, Knut Woltjen, 池谷 真, 加藤友久, 戸口田淳也. 細胞背景は滑膜肉腫特異的融合タンパク SS18-SSX を介したエピジェネティック制御において重要である. 第 37 回日本分子生物学会年会(2014.11.25. 横浜)

松永一仁, 金 永輝, 坂井田功, 戸口田淳也. ヒト iPS 細胞から中胚葉細胞塊を介した側板中胚葉由来間葉系幹細胞の誘導. 第 37 回日本分子生物学会年会(2014.11.26. 横浜)

2) 講演・シンポジウム

戸口田淳也. 整形外科領域における iPS 細胞研究の臨床応用 - 運動器疾患治療の新戦略. 兵庫県整形外科医会学術講演(2014.1.25. 神戸)

戸口田淳也. iPS 細胞応用再生医療の最前線と今後の課題展望. 第 6 回 FIRM 講演会(2014.1.27 京都)

戸口田淳也. iPS 細胞研究の現況と展望. 第 16 回癌治療増感研究会シンポジウム(2014.2.8. 奈良)

戸口田淳也. iPS 細胞を活用した難病の病態解明と創薬. 芝蘭会神戸支部学術講演会(2014.2.11. 神戸)

戸口田淳也. iPS 細胞の医療応用: 現況と展望. 平成 25 年度同泉会総会講演会(2014.2.15. 宇部)

戸口田淳也. 関節軟骨変性病態に対する低分子化合物による治療法の開発. 平成 25 年度医工学フォーラム(2014.2.26.

京都)

戸口田淳也. iPS細胞研究の骨軟骨疾患への応用. 第12回広島 Bone&Joint セミナー(2014.3.8. 広島)

戸口田淳也. 骨軟部腫瘍遺伝子変異のランドスケープ. キュアサルコーマ公開シンポジウム 2014(2014.3.21. 東京)

戸口田淳也. iPS細胞研究の現状と展望. 第73回日本医学放射線学会総会(2014.4.11. 横浜)

Junya Toguchida. Recent advances in iPS cell research and application in Kyoto. 第11回 System Biology Workshop (2014.5.20. Melbourne)

戸口田淳也. 整形外科領域における iPS 細胞研究. 香川県整形外科医会講演会(2014.5.29. 高松)

戸口田淳也. iPS細胞研究の現況と展望. 第89回日本医療機器学会大会(2014.6.13. 新潟)

戸口田淳也. 多能性幹細胞を用いた肉腫研究. ウィルス研・再生研合同講演(2014.6.23. 京都)

戸口田淳也. 整形外科疾患に対する iPS 細胞研究の応用. 第3回千葉慢性疼痛研究会(2014.8.9. 千葉)

戸口田淳也. 運動器疾患における再生医療の現状. ヒューマンサイエンス振興財団将来動向調査班勉強会(2014.11.13.

京都)

戸口田淳也. iPS細胞を活用した難病の原因解明. 細胞研究基金寄附者感謝の集い(2014.11.26. 東京)

戸口田淳也. 細胞治療と微小外科の融合. 第41回日本マイクロサージャリー学会(2014.12.5. 京都)

戸口田淳也. 骨軟骨領域における iPS 細胞研究. 第26回 NPO 法人日本口腔科学会近畿地方部会(2014.12.6. 京都)

器官形成応用分野 Department of Organ Reconstruction

准教授 角 昭一郎

Assoc. 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、免疫抑制法の改良などにより長期成績の改善傾向があるものの、ドナー不足や免疫抑制の副作用の問題は避けがたい。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作製をめざした新しい独自の作成技術として、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 β 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、論文を準備中である。一方、我々はすでに、マウス β 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、サイズの揃った高品質の細胞塊を効率的に作成する基礎的技術として、細胞塊作成用新規培養面の開発研究を行い、全面多孔式培養面を開発して特許出願した。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いるが、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おり、この融合細胞を用いたマクロカプセル化デバイスの作成を検討中である。今後はこのような細胞を用いた細胞塊形成による機能向上と PVA マクロカプセル化による免疫隔離などを組み合わせて、新しい糖尿病治療法の実現を目指して研究を展開する予定である。

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, although the long-term outcome of islet transplantation is becoming better due to improved immunosuppression, donor shortage and adverse effects of immunosuppression remain major problems. 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 is-

lets, 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 manuscript is now under preparation. 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 developed a new device to form cell spheres of uniform size and the results have been applied for a patent. 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 in vivo. These cells are further studied toward macro-encapsulation. We are attempting functional improvement by cell cluster formation of these in vitro processed cells toward realization of new diabetes therapy in combination with PVA-macro-encapsulation technique.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Ohki R, Saito K, Chen Y, Kawase T, Hiraoka N, Saigawa R, Minegishi M, Aita Y, Yanai G, Shimizu H, Yachida S, Sakata N, Doi R, Kosuge T, Shimada K, Tycko B, Tsukada T, Kanai Y, Sumi S, Namiki H, Taya Y, Shibata T, Nakagama H. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111 : E2404-13, 2014.

Noguchi CCY, Furutani E, Sumi S. Mathematical model of glucose-insulin metabolism in type 1 diabetes including digestion and absorption of carbohydrates. *SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration* 7 : 314-320, 2014.

2) 著書・総説等

Sumi S, Yanai G, Qi M, Sakata N, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Hiura A, Gu YJ, Inoue K. Review : Macro-encapsulation of islets in polyvinyl alcohol hydrogel. J. Med. Biol. Eng., 34 : 204-210, 2014.

角 昭一郎. 膵島および再生膵島様細胞移植における移植技術の新構築. 井村裕夫, 清野 進監修, 石井秀始編集, 再生医療シリーズ 膵島の再生医療－膵β細胞の発生と再生をめぐる新展開－. p142-5. 診断と治療社, 東京(印刷中).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

白水泰昌, 柳井伍一, 角 昭一郎. マウス ES 細胞の内胚系細胞への分化誘導. 第 13 回日本再生医療学会総会. 2014 年 3 月 4～6 日, 京都市.

柳井伍一, 楊 凱強, 白水泰昌, 日裏彰人, 角 昭一郎. 間葉系幹細胞と膵島細胞の電気的融合細胞を用いた糖尿病治療. 第 13 回日本再生医療学会総会. 2014 年 3 月 4～6 日, 京都市.

大田明生, 松村和明, 角 昭一郎, 玄 丞. StemCell KeepTM で凍結保存したヒト iPS 細胞の DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析. 第 13 回日本再生医療学会総会. 2014 年 3 月 4～6 日, 京都市.

Yanai G, Yang K-C, Shirouzu Y, Sumi S. Electrofusion of Mesenchymal Stem Cells and Islet Cells for Diabetic Therapy : Details of Methodology. 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine. Aug. 26, 2014, Tao-Yuan, Taiwan.

山本美樹, 高 飛, 大田明生, 玄 優基, 松村和明, 角 昭一郎, 玄 丞. 不凍ポリアミノ酸ベースの凍結保存剤を用いたマウス iPS 細胞の緩慢凍結保存. 第 12 回日本再生歯科医学会学術大会・総会. 2014 年 8 月 26 日, 徳島市.

Sumi S, Yang K-C, Yanai G, Shirouzu Y. A Novel Device for Efficient High Quality Cell Sphere Formation. TER MIS-AP 2013 Annual Conference. Sep. 27, 2014, Daegu, Korea.

角 昭一郎. 血糖管理の安定化を目指すマクロカプセル化膵島の研究－糖尿病再生医療への挑戦－. 第 29 回日本糖尿病合併症学会シンポジウム 6 糖尿病合併症を克服する新戦略. 2014 年 10 月 4 日, 東京都.

OTA A, Matsumura K, Gen Y, Yamamoto F, Sumi S, Hyon S-H. Improvement of Anti-Freezee Polyamino Acid Based Cryopreservation Agents for Slow-Freezing hiPS-Cells. The 5th ACTO Conference, Nov. 10, 2014, Osaka, Japan.

角 昭一郎, 川越雅子, 柳井伍一, 楊 凱強, 白水泰昌. PVA マクロカプセル化膵島－研究結果と今後の展望－. 第 145 会ポータル会. 2014 年 12 月 6 日, 京都市.

2) 講演・シンポジウム

角 昭一郎. 細胞治療の技術革新. 医工学フォーラム 2013.2014 年 2 月 26 日, 京都市.

Sumi S, Yanai G, Yang K-C, Shirouzu Y. Fusion Cells of Islet Cells and Mesenchymal Stem Cells for Diabetes Therapy. 3rd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine. Aug. 29, 2014, Tao-Yuan, Taiwan.

角 昭一郎. 再生医療用細胞塊作製のための全面多穴式培養容器作製用器材の開発. 京都発革新的医療技術研究開発助成事業交流サロン. 2014 年 10 月 15 日, 京都市.

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、生体内再生 “*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が続い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

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は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 applicable 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.

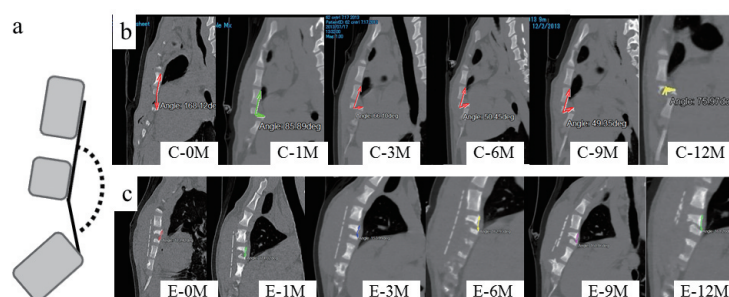
ECM Method

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 tem-

porary 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.



胸骨切除後、実験群では新しい素材(生体吸収性の固い、ポリL乳酸とハイドロキシアパタイトの合成材)で胸壁を再建し、コントロール群では非吸収性の柔らかい素材(ポリプロピレン)で再建。3DCTを使用して術後の胸郭変形を評価すると(a)の通り、矢状断面で残存胸骨のずれの角度を測定した。(b)はコントロール群(非吸収性の柔らかい素材で胸壁再建)では経時的に胸郭変形が進行したのに対して、(c)の実験群では、胸郭変形は有意に少ない結果となり、より良好な胸壁組織の再生を反映していると考えられた。

Anterior chest wall was reconstructed with a bioabsorbable and rigid material (poly-L-lactide matrix (60wt%) and uncalcined and unsintered hydroxyapatite particles (40wt%)) in the experimental group, whereas with a non-rigid and non-absorbable material (polypropylene mesh) in the control group. Postoperative chest wall deformity was assessed using three-dimensional computed tomography with multi-planar reconstruction (a). Representative the mid-sternal sagittal views on the sternal alignment at each point in the control group (b) and in the experimental group (c). The cephalad end of the lower remnant sternum tended to deviate dorsally more remarkably in the control group than in the experimental group. C: the control group, E: the experimental group, 0 M: 0 month(immediately after reconstruction), 1M-12M: 1 month-12 months postoperatively.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文・総説

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七朗, 森本 茂, 橋爪圭司: CRPS と診断された症例の生体内再生治療の適応－各病態別特徴とその治療結果－. 日本ペインクリニック学会誌. 21: 286(2014)

稲田有史, 中村達雄: 神経再生誘導チューブ－京大式 PGA-C tube－. JOHNS.(2014)

稲田有史: 第 358 回『医心伝身』, 週刊ポスト, 東京都, 小学館, 2014

Hamaji, M., Kojima, F., Koyasu, S., Nobashi, T., Tsuruyama, T., Date, H., Nakamura, T.: A rigid and bioabsorbable material for anterior chest wall reconstruction in a canine model. Interact Cardiovasc Thorac Surg.(in press)

Hamaji, M., Kojima, F., Komatsu, T., Tsuruyama, T., Date, H., Nakamura, T.: A synthetic bioabsorbable sheet may prevent postoperative intrapleural adhesions following thoracotomy: a canine model. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 19: 914-20(2014)

- Hamaji, M., Kojima, F., Koyasu, S., Tsuruyama, T., Komatsu, T., Ikuno, T., Date, H., Nakamura, T.: Development of a composite and vascularized tracheal scaffold in the omentum for *in situ* tissue engineering: a canine model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 19: 357-62(2014)
- Hamaji, M., Kojima, F., Nakamura, T.: Collagen fleece failed to prevent intrapleural adhesions in a canine model: failure of murine models to translate into a large animal model. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 62: 202-203 (2014)
- Hamaji, M., Hiraoka, K., Jaroszewski, DE., Deschamps, C.: Modified Robicsek procedure for pectus excavatum in adult patients. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 18: 611-4(2014)
- Hamaji, M., Cassivi, SD., Shen, KR., Wigle, DA., Allen, MS., Nichols, FC., Deschamps, C.: The outcome of pulmonary resection for invasive fungal infection complicating haematological malignancy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 45: e1-5(2014)
- Mizuta, M., Hirano, S., Ohno, S., Hiwatashi, N., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J.: Effect of astaxanthin on vocal fold wound healing. *Laryngoscope.* 124: E1-7(2014)
- Mizuta, M., Hirano, S., Ohno, S., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J.: Restoration of scarred vocal folds using 5 amino acid-deleted type hepatocyte growth factor. *Laryngoscope.* 124: E81-6.(2014)
- Mizuta, M., Hirano, S., Hiwatashi, N., Kobayashi, T., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J.: Effect of AST on age-associated changes of vocal folds in a rat model. *Laryngoscope.* 124: E411-7(2014)
- Mizuta, M., Hirano, S., Kishimoto, Y., Hiwatashi, N., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J.: Pharmacokinetics and safety of human recombinant hepatocyte growth factor administered to vocal folds. *Laryngoscopoe.* 124: 2131-5(2014)
- Hiwatashi, N., Hirano, S., Mizuta, M., Tateya, I., Kanemaru, SI., Nakamura, T., Ito, J., Kawai, K., Suzuki, S.: Biocompatibility and Efficacy of Collagen/Gelatin Sponge Scaffold With Sustained Release of Basic Fibroblast Growth Factor on Vocal Fold Fibroblasts in 3-Dimensional Culture. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* (in press)
- Hiwatashi, N., Hirano, S., Mizuta, M., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J.: Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope.* 12: E461-469(2014)
- Kawai, T., Nishio, K., Mizuno, S., Morita, Y., Nishizawa, Y., Nakamura, T.: A Method of Measuring Elasticity using the Step-out Phenomenon of a Stepper Motor. *Advanced Biomedical Engineering.* 3: 14-20(2014).
- Kawai, T., Shin, N., Nishizawa, Y., Horise, Y., Nishikawa, Y., Nakamura, T.: Mobile locally operated detachable end-effector manipulator for endoscopic surgery. *Int J CARS*(in press).
- Araki, J., Nishizawa, Y., Nakamura, T., Sato, T., Naito, M., Hatayama, N., Hirai, S., Tashiro, K., Koshima, I.: Anorectal autotransplantation in a canine model: the first successful report in the short term with the non-laparotomy approach. *Scientific Reports* 4: 6312(2014)
- Kojima, F., Sato, T., Takahata, H., Okada, M., Sugiura, T., Oshiro, O., Date, H., Nakamura, T.: A novel surgical marking system for small peripheral lung nodules based on radio frequency identification technology: Feasibility study in a canine model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 147: 1384-9(2014)
- Kojima, F., Sato, T., Tsunoda, S., Takahata, H., Hamaji, M., Komatsu, T., Okada, M., Sugiura, T., Oshiro, O., Sakai, Y., Date, H., Nakamura, T.: Development of a novel marking system for laparoscopic gastrectomy using endoclips with radio frequency identification tags: feasibility study in a canine model. *Surg Endosc.* 28: 2752-

2759(2014)

高畑裕美, 小島史嗣, 杉浦忠男, 岡田 実, 佐藤寿彦, 角田 茂, 中村達雄, 伊達洋至, 大城 理. RFID を用いた消化管用クリップの位置特定～イヌ食道における検討～. 日本コンピュータ外科学会誌. 15:329-337 (2014)

Hayakawa, K., Tanikake, M., Kirishima, T., Yoshinami, N., Shintani, H., Yamamoto, E., Morimoto, T.: The incidence of contrast-induced nephropathy (CIN) following transarterial chemoembolisation (TACE) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC). Eur Radiol. 24:1105-1111 (2014)

Otsuki, K., Imaizumi, M., Nomoto, Y., Nomoto, M., Wada, I., Miyake, M., Omori, K.: Effective embryoid body formation from induced pluripotent stem cells for regeneration of respiratory epithelium. Laryngoscope. 124:E8-14 (2014)

Sato, S., Miyake, M., Hazama, A., Omori, K.: Povidone-iodine-induced cell death in cultured human epithelial HeLa cells and rat oral mucosal tissue. Drug Chem Toxicol. 37:268-275 (2014)

Matsuzuka, T., Suzuki, M., Saijo, S., Matsui, T., Nomoto, Y., Ikeda, M., Tada, Y., Nomoto, M., Omori, K.: Usefulness of sentinel node navigation surgery in the management of early tongue cancer. Auris Nasus Larynx. 41:475-478 (2014)

Imaizumi, M., Tani, A., Ogawa, H., Omori, K.: Parotid lymphangioma associated with facial nerve paralysis: A case report. Pediatr Int. 56:784-787 (2014)

大森孝一, 多田靖宏, 野本幸男, 谷亜希子, 仲江川雄太, 金丸眞一, 中村達雄: 生体内組織再生誘導型の人工気管. Surgery Frontier. 21:31-37 (2014)

多田靖宏, 仲江川雄太, 大森孝一: 〈特集みみ・はな・のどの局所薬物療法〉 喉頭腫瘍性病変に対する局所薬物療法. ENTONI. 168:57-62 (2014)

Tamura, K., Harada, Y., Kunimi, M., Takemitsu, H., Hara, Y., Nakamura, T., Tagawa, M.: Autologous bone marrow mononuclear cell transplant and surgical decompression in a dog with chronic spinal cord injury. Exp Clin Transplant. (2014)

Kanemearu, S., Umeda, H., Kanai, R., Tsuji, T., Kuboshima, F., Yamamoto, M., Hirano, S., Nakamura, T.: Regenerative treatment for soft tissue defects of the external auditory meatus. Otol Neurotol. 35:442-8 (2014)

2) 著 書

稲田有史, 中村達雄, 諸井慶七朗, 橋爪圭司, 森本茂: 生体内再生治療. 「ペインクリニックのための新キーワード 135」(小川節郎: 編著, 真興交易株式会社医書出版部: 発行所, 全 342 頁)305-307 (2014)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会等の発表

Nakamura, T.: Development of new artificial nerve: Influence of sodium chloride in the scaffold. ASAIO 60th Annual Conference (2014.6.18-21. Washington, DC)

Shigeno, K., Shionoya, Y., Kaneko, M., Wakatsuki, M., Nakada, A., Honda, M., Kojima, F., Sato, T., Inada, Y., Kanemaru, S., Nakamura, T.: Verify the effect on nerve regeneration from increased blood flow in the nerve con-

- trol area due to stellate ganglion blocks. 41th Annual ESAO Congress(2014.9.17-20. Roma)
- Kaneko, M., Wakatsuki, M., Shigeno, K., Nakada, A., Nakamura, T.: Bone repairing in the canine frontal sinus implanted octacalcium phosphate and collagen composite(II). 41th Annual ESAO Congress(2014.9.17-20. Roma)
- Mizuta, M., Hirano, S., Kobayashi, T., Kanemaru, S., Ito, J.: Effect of astaxanthin on the age-associated change of vocal folds in a rat model. The 135th American Laryngological Association(2014.5.14-15. Las Vegas)
- Nishizawa, Y., Kawai, T., Nakamura, T., Fujiwara, M., Okano, K., Suzuki, Y.: Concept of solo-surgery using a locally operated detachable end-effector manipulator to support endoscopic surgery. SAGES 2014(2014.4.2-5. Salt Lake City)
- 西澤祐吏, 齋藤典男, 伊藤雅昭, 中村達雄, 荒木 淳, 内藤宗和: 肛門機能における陰部神経の役割-陰部神経切離・吻合モデルの検討-. 第20回大腸肛門機能障害研究会(2014.9.8. 東京)
- 河合俊和, 柏木貴行, 西川 敦, 西澤祐吏, 中村達雄: カメラ画像で足動作を認識するハンズフリーインタフェースの提案. 日本コンピュータ外科学会(2014.11.8-9. 大阪)
- Nakamura, H., Matsuno, T., Nakamura, T., Mataga, I.: Comparison of hydroxyapatite-coated implant with titanium implant in experimental peri-implantitis. The 9th Congress of the Asian Academy of Osseointegration. (2014.7.4-5. 札幌市)
- 中村浩樹, 松野智宣, 中村達雄, 又賀 泉: インプラントの表面性状の違いが実験的インプラント周囲炎に及ぼす影響. 第59回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会(2014.10.17-19. 千葉市)
- 中村浩樹, 松野智宣, 中村達雄, 又賀 泉: インプラント周囲炎モデルにおける骨吸収の経時的変化~HAとチタンによる違い~. 第18回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会(2014.11.29-30. 出雲)
- Omori, K., Otsuki, K., Yoshie, S., Imaizumi, M., Nomoto, Y., Nakamura, T.: Generation of ciliated epithelium derived from mouse induced pluripotent stem cells. The 61th CORLAS Meeting.(2014.8.24. Istanbul)
- Nakaegawa, Y., Tada, Y., Nakamura, T., Omori, K.: The way to the practical use of artificial trachea as medical equipment on the basis of Japanese regulations. The 9th East Asian Conference on Phonosurgery(2014 11 29. Taipei)
- 稲田有史: 第2回防府整形外科フォーラム. (2014.10.3. 山口)
- 稲田有史: 穿刺後の総和神経障害について. 日本赤十字社近畿ブロック血液センター定期講演会. (2014.1.30. 大阪)(特別講演)
- 稲田有史: 穿刺後の総和神経障害について. 奈良県赤十字血液センター定期講演会. (2014.3.6. 奈良)(特別講演)
- 稲田有史: 第57回日本手外科学会学術集会. (2014.4.17. 沖縄)
- 稲田有史: 運動器の痛みの治療. 2014年度奈良医大整形外科・臨床研修医合宿研修. (2014.4.20. 奈良)
- 稲田有史: CRPSと診断された症例の生体内再生治療の適応-各病態別特徴とその治療結果-. 日本ペインクリニック学会第48回大会(2014.7.26. 東京)

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

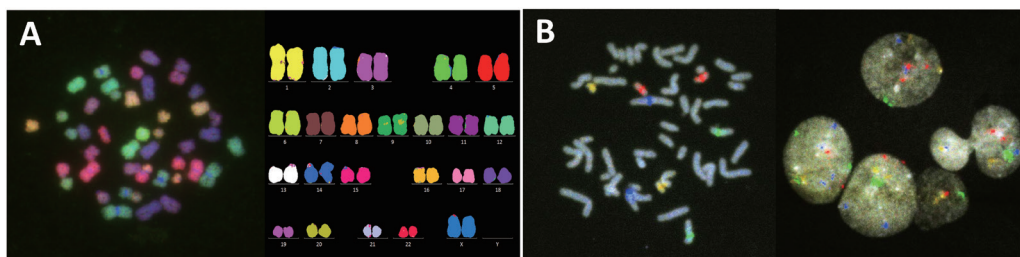
Prof. Norio Nakatsuji

【研究概要】

個体を構成する細胞系譜は一つの受精卵から多能性幹細胞、組織幹細胞等を経て分化成熟を行う。各種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、不妊等の起因となる。当研究グループは幹細胞－生殖細胞サイクルの発生分化制御とゲノム－エピゲノム恒常性の調節機構のクロストーク解明、またその理解に基づく細胞及び個体のゲノム恒常性制御の為の技術基盤の創出を目指し、分子生物学、細胞生物学、遺伝学、オミクス解析等を併せて研究を進めている。

(1) 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細胞と分化体細胞で異なる。これらES細胞と分化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。

(2) 減数分裂を制御する誘導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



ヒト多能性幹細胞の染色体 FISH 解析 (A) M-FISH 解析, (B) 染色体異常検出プローブを用いた FISH 解析 (GSP 研究所との共同開発)

FISH analysis of human PSC (A) M-FISH analysis, (B) FISH analysis using a probe set to detect chromosome alterations in PSC

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、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)生殖細胞の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, MIWI 2 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。

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

- Miyazaki, T., Nakatsuji, N., Suemori, H. Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis* 52: 49-55 (2014)
- Hirata, N., Nakagawa, M., Fujibayashi, Y., Yamauchi, K., Murata, A., Minami, I., Tomioka, M., Kondo, T., Kuo, T.-F., Endo, H., Inoue, H., Sato, S., Ando, S., Kawazoe, Y., Aiba, K., Nagata, K., Kawase, E., Chang, Y.-T., Suemori, Eto, K., Nakauchi, H., Yamanaka, S., Nakatsuji, N., H., Ueda, K., Uesugi, M. A chemical probe that labels human pluripotent stem cells. *Cell Rep.*, 6: 1165-1174 (2014).
- Otsuji, T. G., Bin, J., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J. E., Nishino, T., Hasegawa, K. and Nakatsuji, N. A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Rep.* 2: 734-745 (2014).
- Kuo, T. F., Mao, D., Hirata, N., Khambu, B., Kimura, Y., Kawase, E., Shimogawa, H., Ojika, M., Nakatsuji, N., Ueda, K. and Uesugi, M. Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative. *J Am Chem Soc.* 2136: 9798-9801 (2014).
- Liu, L., Yoshioka, M., Nakajima, M., Ogasawara, A., Liu, J., Hasegawa, K., Li, S., Zou, J., Nakatsuji, N., Kamei, K. and Chen, Y. Nanofibrous gelatin substrates for long-term expansion of human pluripotent stem cells. *Biomaterials* 35: 6259-6267 (2014)
- Hatori, M., Shimozaawa, N., Yasmin, L., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ogura, A., Yagami, K. and Sankai, T. Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in neural differentiation from cynomolgus monkey (macaca fascicularis) embryonic stem cells. *Comp. Med.* 64: 140-147 (2014).
- Takeuchi, H., Nakatsuji, N. and Suemori, H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci. Rep.* 4: article number 4488 (Mar 27, 2014)
- Ichianagi, T., Ichianagi, K., Ogawa, A., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chuma, S., Sasaki, H., Udon, H. HSP 90 α plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucleic Acids Res.* 2014 42(19): 11903-11.
- Chuma, S. LINE-1 of evidence for fetal oocyte attrition by retrotransposon. *Dev Cell.* 2014 29(5): 501-2.
- 鈴木 崇, 末盛博文, 中馬新一郎, 饗庭一博, 中辻憲夫 (2014) メタボローム解析によるヒト多能性幹細胞の品質評価技術の開発島津評論, 70, 123-131.

2) 総 説

- 中馬新一郎 減数分裂の発生制御とゲノム情報の継承. *実験医学*, 32, 853-858 (2014).

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

中馬新一郎 トランスポゾン制御破綻が引き起こす精子形成不全症 第61回日本実験動物学会シンポジウム
(2014.5.15-17. 札幌)

中馬新一郎 マウス精子形成過程のトランスポゾン抑制と RNP 制御 京都大学霊長類研究所研究会(2014.8.26-27.
犬山)

望月綾子 The role of N16 in the maintenance of genome stability and DNA recombination in mice 新学術領域
「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」若手勉強会(2014.7.16-18. 筑波)

2) 講演・シンポジウム

中辻憲夫：ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の実用化に不可欠な大量培養・生産技術の開発, 日本医工学治療学会
第30回学術大会シンポジウム6「再生療法 Update」(2014.3.23. 名古屋)

Norio Nakatsuji: Human pluripotent stem cell research for regenerative medicine and drug discovery – our multi-
disciplinary academia-industry collaboration project in Japan. World Stem Cells Regenerative Medicine Con-
gress 2014(invited lecture) (2014.5.21. London)

中辻憲夫：機能性ポリマーや化合物によるヒト多能性幹細胞の増殖分化制御への応用, 第36回日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム2「新時代の細胞操作技術と医療」(2014.11.18. 東京)

Norio Nakatsuji: Overview of Japan Symposium – Mass culture system, QC, 3D construction, freezing system &
delivery system. World Stem Cell Summit 2014(invited lecture) (2014.12.4. San Antonio)

中辻憲夫：ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の再生医療と創薬への実用化に必要な技術開発：大量培養法と化合物
による分化誘導, 京都大学ウイルス研究所・京都大学再生医科学研究所合同学術講演会(2014.12.22. 京都)

中馬新一郎 相同組み換え制御及び複製ストレス応答に関するノックアウトマウス解析 新学術領域「生殖細胞の
エピゲノムダイナミクスとその制御」第2回領域シンポジウム(2014.10.31-11.1. 福岡)

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施設による臨床用ヒト ES 細胞バンクの構築

これまでに分配された十分な利用実績のあるヒト ES 細胞株を医薬品 GMP レベルで使え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。これらの研究開発の成果をもとにして、臨床用ヒト ES 細胞バンクを既存の ES 細胞のクリーンアップによる実証研究を行った。これらに加え、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寄与している。

ヒト多能性幹細胞からのインスリン産生細胞への誘導

膵臓・膵島細胞移植は I 型糖尿病など重度の糖尿病の治療に有効であるが、ドナー不足が大きな問題となっている。その解決法としてヒト多能性幹細胞(hPSCs)の利用が期待されている。hPSCs からインスリン産生細胞(IPCs)への誘導に関する報告は多くあるが、誘導効率が低く、グルコース応答性を有する mature IPCs の獲得が困難である。また細胞株の違いにより再現性が十分でないなどの問題が知られていた。そこで効率良くインスリン産生細胞を誘導できる細胞株間で再現性の高い方法の確立を目指した。内胚葉系列組織の発生過程を模倣するように各種の成長因子や低分子化合物を組み合わせ分化誘導方法の最適化を行ない、インスリン産生細胞の前駆細胞である PDX1 陽性細胞を 70-80% の高効率で誘導できる方法を確立した。前駆細胞から成熟したインスリン産生細胞の誘導に 3D 培養が有効であることを見だし、最終的にインスリン陽性細胞を約 30% の効率で作出できるようになった。またこれらの細胞がグルコースに応答してインスリンを分泌することも確認した(図 1)。

これらの成果は、ヒト膵臓のインスリン分泌能獲得のメカニズムを理解するのに有益であり、糖尿病に対する細胞療法や創薬の基盤技術となると期待される。

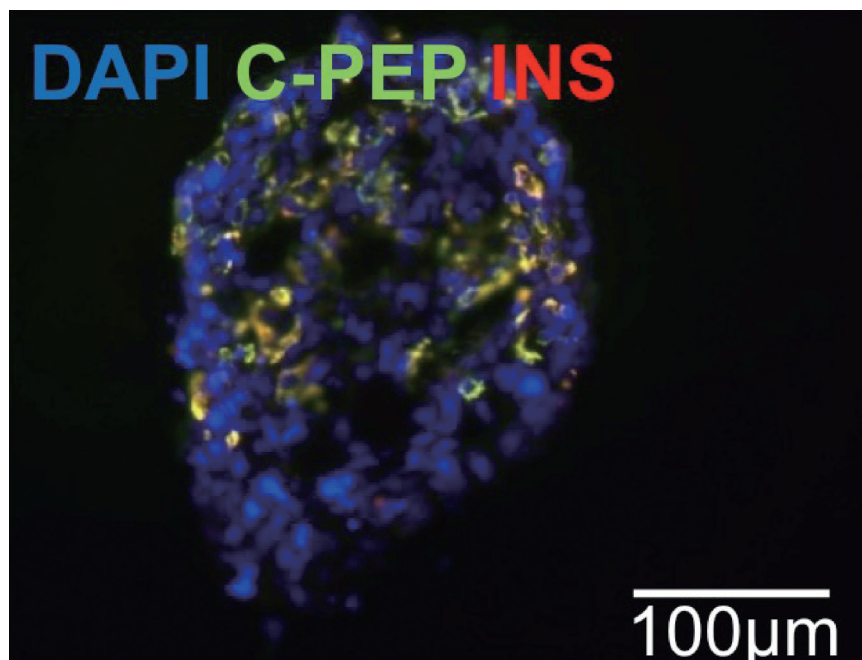


図1: 3D培養法によるインスリン産生細胞の誘導
約30%の効率でインスリン産生細胞が誘導される。またインスリン産生のグルコース応答性も確認されている。

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.

Directed differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture

Insulin-producing cells (IPCs) derived from human pluripotent stem cells (hPSCs) may be useful in cell therapy and drug discovery for diabetes. We developed a robust differentiation method for induction of mature IPCs from hPSCs. The protocol enables to induce PDX1-positive pancreatic progenitor cells at high efficiency. We also found that 3D culture of PDX1-positive cells is effective to induce mature IPCs. The mature IPCs secreted insulin in re-

sponse to glucose stimulation, indicating a functional IPC phenotype. Our method was found to be applicable to a wide variety of hPSCs.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Minami I, Tomioka M, Kondo T, Kuo TF, Endo H, Inoue H, Sato SI, Ando S, Kawazoe Y, Aiba K, Nagata K, Kawase E, Chang YT, Suemori H, Eto K, Nakauchi H, Yamanaka S, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* Mar 4(2014).

Miyazaki T, Nakatsuji N, Suemori H. Optimization of slow cooling cryopreservation for human pluripotent stem cells. *Genesis* **52**(1): 49-55(2014).

Kazuki Y, Yakura Y, Abe S, Osaki M, Kajitani N, Kazuki K, Takehara S, Honma K, Suemori H, Yamazaki S, Sakuma T, Toki T, Shimizu R, Nakauchi H, Yamamoto T, Oshimura M. Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies. *Sci Rep.* **27 ; 4**: 6136(2014).

Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* **3**(9): 992-1001(2014).

Hatori M, Shimozaawa N, Yasmin L, Suemori H, Nakatsuji N, Ogura A, Yagami K, Sankai T. Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in neural differentiation from cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*) embryonic stem cells. *Comp Med.* **64**(2): 140-7(2014).

Takeuchi H, Nakatsuji N, Suemori H. Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Sci Rep.* **27 ; 4**: 4488(2014).

Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Minami I, Tomioka M, Kondo T, Kuo TF, Endo H, Inoue H, Sato S, Ando S, Kawazoe Y, Aiba K, Nagata K, Kawase E, Chang YT, Suemori H, Eto K, Nakauchi H, Yamanaka S, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. A chemical probe that labels human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* **27 ; 6**(6): 1165-74(2014).

Kuo T-F, Mao D, Hirata N, Khambu B, Kimura Y, Kawase E, Shimogawa H, Ojika M, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative. *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 9798-801(2014).

2) 総説

ES・iPS細胞の特性解析と品質管理 平井雅子, 末盛博文: ES・iPS細胞実験スタンダード(2014, 羊土社)

Miyazaki T, Kawase E: Efficient and scalable culture of single dissociated human pluripotent stem cells using recombinant E8 fragments of human laminin isoforms. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* Wiley, in press

Kawase E.: Efficient Expansion of Dissociated Human Pluripotent Stem Cells using a Synthetic Substrate. *Methods Mol. Biol.* **Springer** (2014)

Kawase E.: Development of Culture Substrates and Culture Media for Efficient Expansion of Human Pluripotent Stem Cells. In Lecture Notes on Cell Biology and Materials Sciences pp. 89-97 (Eds. Yuh-Jyh Jong and Norio Nakatsuji) University System of Taiwan November, (2014)

◆ 学会等の講演 ◆

1) 学会・研究会発表

末盛博文：再生医療製品の中間体としての ES/iPS 細胞とその製造関連材料の品質 バイオロジクスフォーラム第 11 回学術集会(2014.1.24. 東京)

高田圭, 平井雅子, 川瀬栄八郎, 末盛博文, 中辻憲夫, 高橋恒夫：ヒト ES/iPS 細胞における凍結保存の解析：コロニーの高頻度の細胞内氷晶形成 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)

平井雅子, 高田圭, 濱生麻里, 榎木美美, 川瀬栄八郎, 末盛博文, 中辻憲夫, 高橋恒夫：既存株クリーンアップによる臨床用ヒト ES 細胞株バンキングの構築 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)

高橋恒夫, 田中啓二, 奥田真治, 平井雅子, 高田圭, 川瀬栄八郎, 末盛博文, 中辻憲夫, 北川正成：ヒト ES/iPS 細胞調製における残存マウスフィーダー細胞の測定法の開発 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)

川瀬栄八郎：多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の実用化に必要な技術開発：未分化細胞の大量培養と化合物分化誘導による有用細胞の大量生産システム 第 13 回日本再生医療学会総会ランチョンセミナー LS-21(2014.3.6. 京都)

川瀬栄八郎：多能性幹細胞の大量培養の実現化に向けて～培養基質と培養液の開発を中心として～鳥取大学医学部次世代高度医療推進センター 特別講演会：ヒト ES 細胞倫理講習会(2014.3.28. 米子)

川瀬栄八郎：ヒト多能性幹細胞を用いた動態評価系の構築 IncuCyte ユーザーミーティング ライブコンテンツイメージングセミナー(2014.6.5. 品川)

Kaori Yamauchi, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori.

Monitoring of the cardiac developmental process using a $Nkx2-5^{eGFP}/MLV2^{mCherry}$ human embryonic stem cell line. 第 12 回 ISSCR(2014.6.18-21. バンクーバー)

Kei Takada, Masako Hirai, Mari Hamao, Fumi Kashigi, Eihachiro Kawase, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Tsuneo A. Takahashi.: High frequency of intracellular ice formation during slow cooling in colonies of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells: comparison with single dissociated cells. 第 12 回 ISSCR(2014.6.18-21. バンクーバー)

Masako Hirai, Kei Takada, Mari Hamao, Fumi Kashigi, Eihachiro Kawase, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Tsuneo A Takahashi.: Validation of clinical grade human embryonic stem cells produced under GMP. 第 12 回 ISSCR(2014.6.18-21. バンクーバー)

Tsuneo A. Takahashi, Keiji Tanaka, Shinji Okuda, Masako Hirai, Kei Takada, Eihachiro Kawase, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji, Masanari Kitagawa.: A new method for the detection of residual mouse feeder cells contaminated in the products of human pluripotent stem cells. 第 12 回 ISSCR(2014.6.18-21. バンクーバー)

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

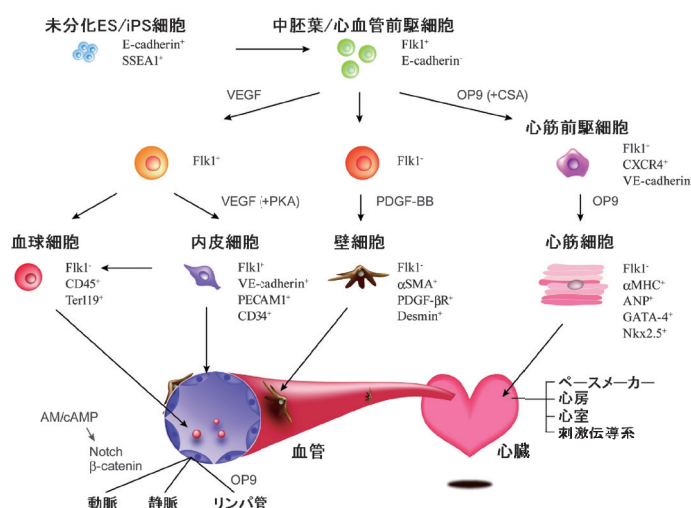
分野主任 教授 山下 潤

Prof. Jun K. Yamashita

【研究概要】

幹細胞分化制御研究分野では、多能性幹細胞(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。

多能性幹細胞は、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、多能性幹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)。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。心筋細胞は分化後増殖能を失うが、この増殖能を維持することができる化合物群を同定し、心筋細胞増殖に関与する細胞内シグナルの一部を明らかにした(Uosaki, **Circ Cardiovasc Genet**, 2013)。

幹細胞分化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、心筋梗塞亜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

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 β -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)。また、ヒト iPS 細胞においても心血管細胞混合シートを作製し、ラット心筋梗塞モデルへの移植による心機能改善効果を示した (Masumoto, **Sci Rep**, 2014)。

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) 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)
- 5) ES/iPS 細胞分化系における新しい遺伝子機能解析システムの開発
 - i) 誘導性 shRNA を用いた分化段階特異的遺伝子発現制御 ES 細胞システム (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006)
 - ii) CRISPR/Cas9 を用いたプロモーター挿入法による簡便な遺伝子欠損/レスキューシステム (Matsunaga, **Biochem Biophys Res Commun**, 2014)

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 日文科科学大臣承認)
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; Masumoto, **Sci Rep**, 2014) (東京女子医大・京都大学心臓血管外科との共同研究)
 - iv) ゼラチンハイドロゲルを用いた心臓細胞シートの高度積層化(再生医科学研究所・田畑研究室との共同研究)
 - v) 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
 - i) 分化段階特異的に心筋細胞増殖を制御する低分子化合物 (Uosaki, **Circ Cardiovasc Genet**, 2013).

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 suc-

ceeded 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*. Recently, we found several small molecules and intracellular signaling involved in cardiomyocyte proliferation (Uosaki, **Circ Cardiovasc Genet**, 2013).

Combining our technologies in stem cells and a cell sheet method (Tokyo Women's Medical University), we generated a cardiovascular 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 differentiation 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⁺ cells (Yamamizu, **Blood**, 2009). This effect is mediated by CREB-induced gene expression of an Ets family transcription factor, Etv2 (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 β -catenin directly interact in Flk1⁺ 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

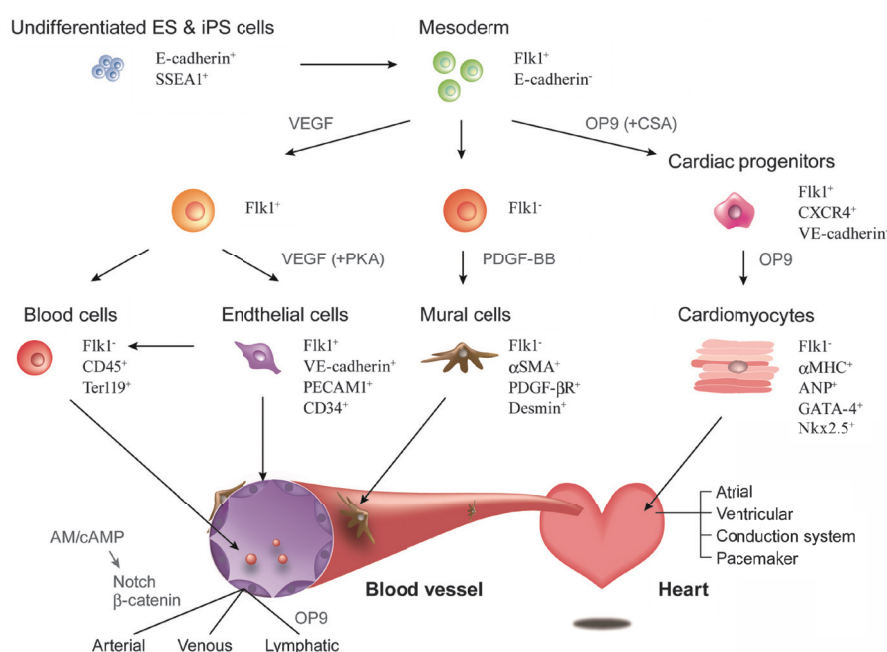


Fig. 1 : Cardiovascular development in ES and iPS cell *in vitro* differentiation

though 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). We recently generated cardiovascular cell sheets from human iPS cells and demonstrated the functional recovery in rat myocardial infarction model after the sheet transplantation (Masumoto, **Sci Rep**, 2014).

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.

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)
- 5) Gene manipulation systems in ES/iPS differentiation
 - i) Inducible shRNA expression for differentiation stage-specific gene knockdown (Hiraoka-Kanie, **Biochem Biophys Res Commun**, 2006)
 - ii) Gene knockout/rescue system by promoter insertion with CRISPR/Cas9 (Matsunaga, **Biochem Biophys Res Commun**, 2014)

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

iii) Establishment of cardiovascular cell differentiation system of mouse iPS cells (Narazaki, **Circulation**, 2008 ; **Best Paper Award** in Basic Science category, Circulation 2008).

iv) Novel efficient cardiomyocyte induction and purification method with VCAM1 (Uosaki, **PLoS One**, 2011)

v) Cell sheet transplantation strategies with iPS cell-derived cardiac cell population. (Masumoto, **Stem Cells**, 2012 ; Masumoto, **Sci Rep**, 2014) (Collaboration with Tokyo Women's Medical University)

vi) Efficient stacking of cardiovascular cell sheets with gelatin hydrogel microsphere (collaboration with Prof. Tabata, Institute for Frontier Medical Sciences)

vii) 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

i) Small molecules controlling developmental stage-specific cardiomyocyte proliferation (Uosaki, **Circ Cardiovasc Genet**, 2013)

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

(* corresponding author)

Matsunaga T, Yamashita JK* : Single-step generation of gene knockout-rescue system in pluripotent stem cells by promoter insertion with CRISPR/Cas9. **Biochem Biophys Res Commun**, 444 : 158-163, 2014. doi : 10.1016/j.bbrc.2014.01.037.

Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Kataoka-Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. : Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. **Nat Commun**. 5 : 4552, 2014. doi : 10.1038/ncomms5552.

Cho SW, Park JS, Heo HJ, Park SW, Song S, Kim I, Han YM, Yamashita JK, Youm JB, Han J, Koh GY. : Dual modulation of the mitochondrial permeability transition pore and redox signaling synergistically promotes cardiomyocyte differentiation from pluripotent stem cells. **J Am Heart Assoc**. 3(2):e000693, 2014. doi : 10.1161/JAHA.113.000693.

Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK* : Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells

for cardiac regeneration. **Sci Rep.** 4: 6716, 2014. doi: 10.1038/srep06716

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 武田匡史, 山下 潤: 「iPS 細胞由来心筋特異的前駆細胞群の探索」, 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.5. 京都)
- Takeda T, Yamashita JK.: Identification and application of human iPS derived-cardiac progenitor enriched population for cardiac regeneration. The 3rd Retreat of Center for iPS Cell Research and Application (CiRA) (2014.4.19. Shiga)
- 武田匡史, 山下 潤: 「ヒト iPS 細胞由来心筋特異的前駆細胞の同定」, 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II (2014.9.5-6. 神戸)
- Fukushima H.: Novel small chemicals potentially enhance cardiomyocyte differentiation from pluripotent stem cells. The 7th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (2014. 1.16-18. Osaka)
- 福島弘之: 「多能性幹細胞システムを用いた新規心筋分化誘導化合物の同定」, 第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3.4-6. 京都)
- 福島弘之: Novel Small Compounds Potently Induce Cardiomyocytes from Various Progenitor Populations. 第 78 回日本循環器学会学術総会 (2014.3.21-23. 東京)
- Fukushima H.: Identification of novel chemicals potentially inducing cardiomyocyte differentiation from mouse and human pluripotent stem cells. ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 12th Annual Meeting (2014. 6.18-21. Vancouver, Canada)
- Ikuno T.: Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture for realization of regenerative medicine. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 12th Annual Meeting. (2014.6.20. Vancouver, Canada)
- Ikuno T.: Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells based on monolayer and serum-free culture. ESC Congress2014. (2014.8.31. Barcelona, Spain)
- 幾野 毅: Scalable and highly efficient endothelial cell differentiation methods from human induced pluripotent stem cells for realization of regenerative medicine. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II. (2014.9.6. Kobe)
- 幾野 毅: 「2 型血管内皮細胞増殖因子受容体陽性細胞の純化再培養によるヒト iPS 細胞からの血管内皮細胞分化誘導の効率化」, 第 67 回日本胸部外科学会総会 (2014.10.03. 福岡)

2) 講演・シンポジウム

- Yamashita JK.: Differentiation System of Cardiovascular Cells from iPS Cells. 1st Think Tank Meeting on Cardiac Safety 2014 in Kirishima. (2014. 1. 11-12. Kirishima, Kagoshima)
- Yamashita JK.: Combinatorial Approaches with Pluripotent Stem Cells, Small Molecules, and Tissue Engineering towards Cardiac Regeneration. CiRA International Symposium 2014 (2014. 1.17. Suita, Osaka)
- 山下 潤: 「多能性幹細胞からの心血管分化・発生」, 第 13 回日本再生医療学会シンポジウム「血管生物学の現状

と血管の発生・新生」(2014.3.4. 京都)

山下 潤：「ES/iPS細胞心筋分化システムを用いた新しい心筋分化再生治療薬の開発」日本循環器学会 TR 振興事業報告会(2014.3.23. 東京)

Yamashita JK.: Blood vessels for cardiac regeneration with stem cells. 2014 International Vascular Biology Meeting(2014. 4. 14-17. Kyoto)

山下 潤：「多能性幹細胞を用いた次世代心臓再生治療戦略の開発」, 第 35 回日本炎症・再生医学会 日本再生医療学会ジョイントシンポジウム「幹細胞分化から見た再生医療」(2014.7.3. 沖縄)

山下 潤：Multiple Approaches for Cardiac Regeneration with Pluripotent Stem Cells, Small Molecules, and Tissue Engineering. 最先端セミナー(熊本大学リエゾンラボ研究会)(2014.7.16. 熊本)

山下 潤：「多能性幹細胞由来心血管細胞の創薬および再生医療への応用」, 第 6 回メディバイオ事業研究会講演会(山口大学医学部消化器病態内科学・再生医療の実現化ハイウェイセミナー)(2014.7.24. 山口)

山下 潤：「多能性幹細胞を用いた多面的心血管分化再生戦略」, ゲノム創薬・医療フォーラム第 2 回談話会「再生医療における創薬戦略」(2014.8.7. 東京)

Yamashita JK.: Application for High Throughput Drug Screening with human iPS cell derived cardiomyocyte. iPS related activities in Japan / application for safety evaluation using human iPS cell-derived cardiomyocyte. CiRA-Boehringer Ingelheim iPS Symposium(2014.10.9. Kyoto)

Yamashita JK.: Next Generation Strategies for Cardiac Regeneration with Pluripotent Stem Cells, Small Molecules, and Tissue Engineering. 第 5 回アジア細胞治療学会 (ACTO2014)(2014.11.10. Osaka)

Yamashita, JK.: Multiple Approaches for Cardiac Regeneration Using Pluripotent Stem Cells. American Heart Association Scientific Meeting 2014, Joint AHA/Japanese Circulation Society Session: Use of ES/iPS Cells for Cardiovascular Medicine(2014.11.18. Chicago, USA)

山下 潤：「ヒト iPS 細胞からの効率的な心筋細胞誘導」, 第 11 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム「ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて」(2014.12.9. 東京)

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。

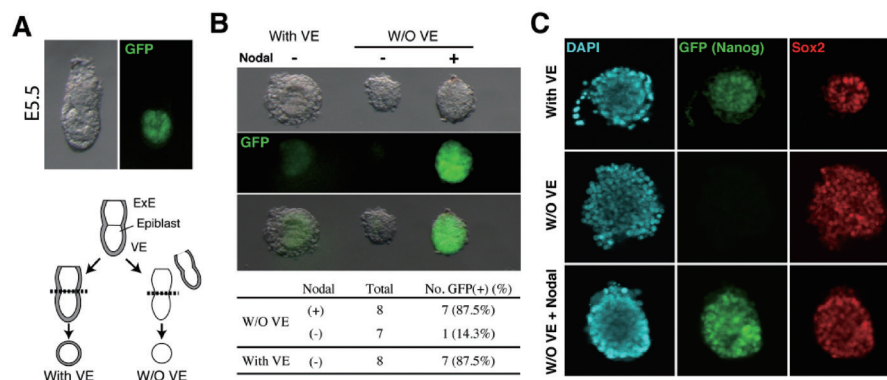


図1 マウス初期胚エピブラストにおける Nodal 依存的な Nanog 発現
(A) 5.5 日齢 Nanog-GFP トランスジェニック胚での Nanog 発現 (B) Nodal を発現する近位内胚葉に依存した Nanog 発現 (C) Nodal-Smad2 シグナリング経路に制御される Nanog 発現

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

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、一步一步クリアすることで基礎研究の社会への貢献が実現できる。

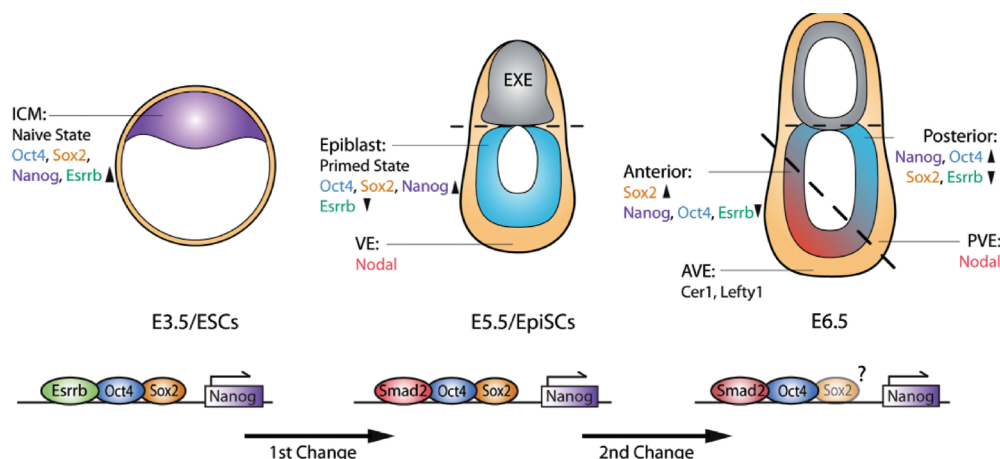


図2 マウス着床初期胚における *Nanog* 遺伝子の機能と発現制御のダイナミックな変化

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.

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) acquisition 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**

- Pasque, V., Tchieu, J., Karnik, R., Uyeda, M., Sadhu Dimashkie, A., Case, D., Papp, B., Bonora, G., Patel, S., Ho, R., Schmidt, R., McKee, R., Sado, T., Tada, T., Meissner, A., Plath, K.: X chromosome reactivation dynamics reveal stages of reprogramming to pluripotency. *Cell*, **159**, 1681-1697 (2014)
- Sun, L. T., Yamaguchi, S., Hirano, K., Ichisaka, T., Kuroda, T., Tada, T.: Nanog co-regulated by Nodal/Smad2 and Oct4 is required for pluripotency in developing mouse epiblast. *Dev Biol*, **392**, 182-192 (2014)
- Matsumura, T., Tatsumi, K., Noda, Y., Nakanishi, N., Okonogi, A., Hirano, K., Li, L., Osumi, T., Tada, T., Kotera, H.: Single-cell cloning and expansion of human induced pluripotent stem cells by a microfluidic culture device. *Biochem Biophys Res Commun*, **453**, 131-137 (2014)
- Terao, K., Gel, M., Okonogi, A., Fuke, A., Okitsu, T., Tada, T., Suzuki, T., Nagamatsu, S., Washizu, M., and Kotera, H.: Subcellular glucose exposure biases the spatial distribution of insulin granules in single pancreatic beta cells. *Sci Rep*, **4**, 4123 (2014)

◆ 学会等の発表 ◆**1) 講演・シンポジウム**

- 多田 高: iPS 細胞からのメッセージ:「倉敷天城高等学校講演会」(2014.06.03, 岡山)
- Tada, T.: Conversion of intermediately reprogrammed stem cells to human iPS 「International Symposium Reprogrammed Stem Cells」(2014, March 20-22, Berlin, GERMANY)

附属再生実験動物施設

Laboratory of Animal Experiments for Regeneration

施設長・教授 近藤 玄

Acting Head, 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24年度イス；147頭、サル；1頭、ウサギ；40羽、ラット；119匹、マウス；7,135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26年8月版による)。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を専任教授1名・技術職員3名・非常勤職員17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)マウス飼育室は稼働を開始してから12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もしれない。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。

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. マウス精子の受精能獲得機構の解明

哺乳動物の精子は、精巣で産生された直後には受精する能力がなく、段階的な成熟過程を経て完全な受精能を獲得する。このプロセスを解明することは、不妊症の診断・治療や実験動物作出の効率化につながる。これまでの我々の主な研究成果は以下のとおりである。

1. 生体内での GPI アンカー型タンパク質(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、同タンパク質が精巣において高レベルに遊離していることを見出した(Kondoh G. et al. *FEBS lett.* 458, 299-303, 1999)。
2. 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。ここでは、まず、ACE には、従来のジペプチダーゼ活性とは別に GPI-AP 遊離活性(GPIase)があることを酵素学的な解析から示した。また、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、同マウスの精子をジペプチダーゼ欠損 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 GPIase 活性により精子受精能獲得に重要な役割を担っていることを示した(Kondoh G. et al. *Nat. Med.*, 11, 160-166, 2005)。
3. 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、精巣上体精子を採取し、精子成熟を誘導する methyl- β -cyclodextrin(M- β -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。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- β -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。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を示した(Watanabe H. and G. Kondoh *J. Cell Sci.*, 124, 2573-2581, 2011)。
4. SMR 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、精子成熟が発動する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 では精子および精巣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を比較すると、210 個の遺伝子が3>2の発現上昇を示した。次にこの中から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、さらにノックアウトマウスデータベースの検索を行い、その結果、雌生殖路内で精子成熟を誘導する因子としてリポカリン2(Lipocalin2, Lcn2)を見出した。野生型マウスの卵管に遊走した精子では、SMRが起こるが、Lcn2 ノックアウトマウスではその変化が顕著に減少していた。Lcn2 は細胞膜を構成する主要リン脂質のひとつであるフォスファチジルエタノールアミン (PE)と直接結合するとほぼ同時にラフトの再構成を誘導した。またこの反応がプロテインキナーゼ A (PKA)活性に依存しているが、PI3-K, Raf-MAPK, チロシンリン酸化には依存していないことを見出した。さらに Lcn2 はコレステロール遊離を引き起こして、精子成熟初期過程を完了した。これらの結果から、我々は、哺乳動物には従来から知られているアルブミンを介する精子成熟メカニズムに加えて、もう一つの精子成熟経路が存在することを示した(Watanabe, H. et al. *Development*, 141, 2157-2164, 2014)。

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。最近、Tol2 トランスポゾンや CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いた簡易な遺伝子改変マウス作出技術が開発された。当施設でもこれらを積極的に取り入れて、利用者の利便性や3Rに基づくマウス作出をこれからも図ってゆく所存である。これらの技術集約のもとに、過去9年間で10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。

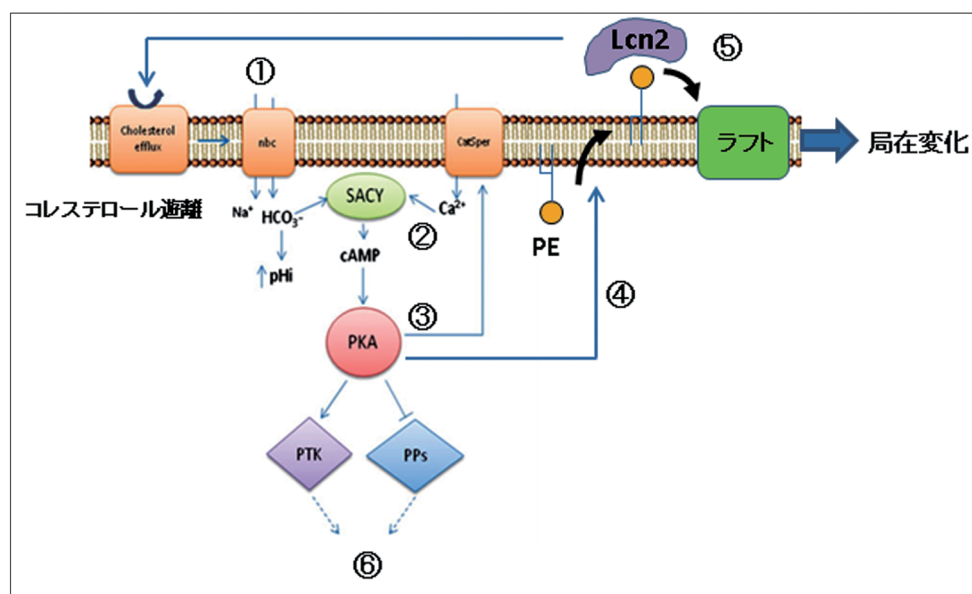


図 我々の考える精子成熟の分子機構。

- ①重炭酸イオンの流入
- ②アデニレートサイクラーゼ(SACY)活性
- ③ PKA 活性
- ④ PE の細胞膜内葉から外葉への移行
- ⑤ Lcn2 の PE への結合によるラフトの局在変化とコレステロール遊離
- ⑥タンパク質のチロシンリン酸化、ハイパーアクチベーション、先体反応の準備

Mammalian sperm undergo multiple maturation steps after leaving the testis in order to become competent for fertilization, although the molecular mechanisms underlying this process remain unclear. In terms of identifying factors crucial for these processes, we found that lipocalin2 (*Lcn2*) can trigger sperm maturation. Most sperm that migrated to the oviduct of wild-type female underwent lipid raft reorganization and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein shedding, signatures of sperm maturation, but few did so in *Lcn2* null mice. Furthermore, we found that LCN2 binds to membrane phosphatidylethanolamine (PE) to reinforce lipid raft reorganization via a PKA-dependent mechanism and triggers sperm to acquire fertility by facilitating cholesterol efflux. These observations imply that mammals possess another mode for sperm maturation, other than the albumin-mediated pathway.

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

原著論文

Kim, C-J, Y. Tambe, K-I. Mukaisho, H. Sugihara, T. Isono, H. Sonoda, T. Shimizu, G. Kondoh, and H. Inoue. Female-specific rectal carcinogenesis in cyclin D1b transgenic mice. *Carcinogenesis*, 35-1, 227-236 (2014).

Watanabe, H., T. Takeo, H. Tojo, K. Sakoh, T. Berger, N. Nakagata, T. W. Mak, and G. Kondoh. Lipocalin2 binds to membrane phosphatidylethanolamine to induce lipid raft movement in a PKA-dependent manner and modulates sperm maturation. *Development*, 141, 2157-2164 (2014).

◆ 学会等の発表 ◆

学会・研究会発表

渡邊仁美, 竹尾 透, 東城博雅, 酒匂一仁, 中湯直己, Tak W. Mak, 近藤 玄 精子成熟因子としての自然免疫因子リポカリン2 第61回日本実験動物学会 2014, 札幌市.

(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、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)までをも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。

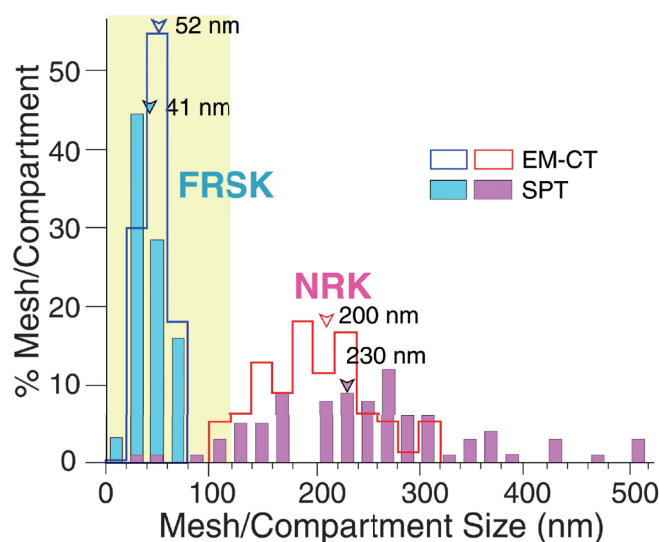


図 1

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。

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。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 averaging 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

- Hiramoto-Yamaki, N., Tanaka, K. A., Suzuki, K. G., Hirosawa, K. M., Miyahara, M. S., Kalay, Z., Tanaka, K., Kasai, R. S., Kusumi, A., and Fujiwara, T. K. : Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized plasma membranes. *Traffic*. **15** : 583-612(2014)
- Kalay, Z., Fujiwara, T. K., Otaka, A., and Kusumi, A. : Lateral diffusion in a discrete fluid membrane with immobile particles. *Phys. Rev. E*. **89**(2) : 022724(2014)
- Kasai, R. S. and Kusumi, A. : Single-molecule imaging revealed dynamic GPCR dimerization. *Curr Opin Cell Biol*. **27C** : 78-86(2014)
- Kusumi, A., Tsunoyama, T. A., Hirosawa, K. M., Kasai, R. S., and Fujiwara, T. K. : Tracking single molecules at work in living cells. *Nature Chemical Biology*. **10**(7) : 524-532(2014)

2) 和文総説

鈴木健一, 楠見明弘: シグナル伝達におけるラフトの役割. 分子消化器病. **11**(4):65-69(2014)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 国際学会・外国の学会

1A) 国外開催

Kusumi, A.: Hierarchical organization of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking. Asian Chemical Biology Initiative 2014 Manila Meeting(2014.1.24-27 Manila, Philippines)

Kusumi, A.: Hierarchical and dynamic organization of the plasma member for signal transduction as revealed by single-molecule tracking. The 14th Hunter Meeting(Keynote Lecture) (2014.3.25-28 Hunter Valley, Australia)

Kusumi, A.: Membrane mechanisms: Concerted action of membrane domains for signal transduction in the plasma membrane. 8th IUPAP International Conference on Biological Physics(2014.6.18-22 Beijing, China)

Kusumi, A.: Membrane mechanisms as revealed by single-molecule tracking in living cells. The Biennial British Biophysical Society Conference(Keynote Lecture) (2014.7.9 -11 Coventry, U.K.)

Kusumi, A.: Tracking single molecules at work in the plasma membrane of living cells. First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies(Keynote Closing Lecture) (2014.8.24-29 Split, Croatia)

Kusumi, A.: Unit raft mechanism for signal transduction revealed by single-molecule tracking. Biomembrane Days 2014(2014.9.1-3 Berlin, Germany)

Kasai, R.: Dynamic monomer-dimer equilibrium of G-protein-coupled receptors as detected by single-molecule tracking. ComBio 2014(2014.9.28-10.2 Canberra, Australia)

Kusumi, A.: Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking. ComBio 2014(Plenary Lecture) (2014.9.28-10.2 Canberra, Australia)

Kusumi, A.: Basic unit rafts for raft formation and function as revealed by single-molecule tracking. Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cell Biology(KSMB) 2014(2014.10.21-10.23 Seoul, Korea)

Kusumi, A.: Plasma membrane domain mechanisms for signal transduction as revealed by single-molecule tracking. 2014 Symposium in Chemical Biology(2014.11.27 Lausanne, Switzerland)

1B) 国内開催

Kusumi, A.: Organizing principles of the plasma membrane for signal transduction: Three-tiered hierarchical meso-scale domain architecture revealed by single-molecule tracking. Single Protein Dynamics in Cellulo 2014: Spatio-Temporal, Structural and Quantitative Analyses(2014.4.21-25 Okinawa)

2) 国外の大学・研究機関での招待講演

Kusumi, A.: Hierarchical organization of the plasma membrane for signal transduction as revealed by single-molecule tracking. College of Chemistry and Molecular Science, Wuhan University (2014.3.10 Wuhan, China)

Kusumi, A.: Unit raft hypothesis: a proposition based on advanced single-molecule imaging results. Wuhan Insti-

tute of Virology, Chinese Academy of Sciences(2014.3.11 Wuhan, China)

Kusumi, A.: Organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction as revealed by single-molecule tracking. Toxicology Unit, Medical Research Council and the University of Leicester(2014.7.8 Leicester, U.K.)

Kusumi, A.: Tracking single fluorescent molecules at work in living cells: Revealing organizing principles of the plasma membrane for signal transduction. 2014 HeKKSaGOn Summer School(2014.9.1-10 Karlsruhe, Germany)

3) 国内での招待講演

楠見明弘：3つの細胞膜階層メゾ構造が担うシグナル変換：1分子追跡・操作の楽しみ，科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業 ERATO「村田脂質活性構造プロジェクト」報告会(2014.7.24. 豊中)

楠見明弘：細胞膜メゾドメインのシグナル機構：1分子追跡による解明，第6回薬学の未来を考える京都シンポジウム「イメージング技術が切り開く創薬・病態研究の未来」(2014.8.2. 京都)

楠見明弘：シナプスとイニシャルセグメント領域における細胞膜分子の異常な拡散挙動：1分子追跡による解明，第37回日本神経科学学会大会 シンポジウム S2-B-1「Sculpting the neuronal intracellular environment: from single molecule behavior to local signal integration」(2014.9.11-13. 横浜)

楠見明弘，宮原愛美，藤原敬宏：神経細胞軸索の細胞膜にある2次元拡散障壁は分子選択性フィルターである，第52回日本生物物理学会年会 シンポジウム 1SEP「システム協同性が操る神経細胞機能」(2014.9.25-27. 札幌)

楠見明弘：神経細胞膜にある分子種選択性2次元拡散障壁，第87回日本生化学会大会 イノベーションの基盤となる生化学 シンポジウム 2S13a「神経複雑系機能を担う協同性の生化学」(2014.10.15-18. 京都)

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

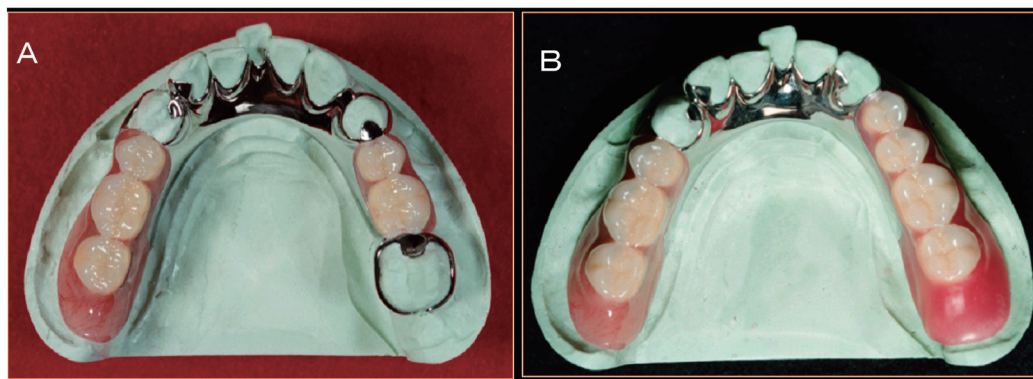
【研究概要】

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】

◆学会等の発表◆

1) 学会・研究会発表

Azuma T., Kuribayashi H., Takizawa O., Nakai R., Mori Y., Yoshioka Y., Togaya T., Liu G.: Development of a temperature measurement method using MR Spectroscopy, 電子情報通信学会 ヒューマンコミュニケーショングループ情報の認知と行動研究会ワークショップ 2014(2014.10.1-2. 岡山)

東 高志, 栗林秀人, 滝沢 修, 中井隆介, 森 勇樹, 吉岡芳親, 都賀谷紀宏, 劉 国相: 7T MRI の 1H-MRS による水-NAA の共鳴周波数変化を用いた温度計測, 第 42 回日本磁気共鳴医学会大会(2014.9.18 京都)

東 高志, 滝沢 修, 栗林秀人, 中井隆介, 吉岡芳親, 都賀谷紀宏, 劉 国相: プロトンおよびリン MR 信号を用いた 7T MRI による新しい温度計測法の開発, 第 42 回日本磁気共鳴医学会大会(2014.9.18 京都)

2) 講演・シンポジウム

都賀谷紀宏: レーザーの基礎とレーザー加工の最近の話題, 「第 29 回 DLP フォーラム」(2013.12.7. 京都)

都賀谷紀宏: 歯科技工士法を考える - 『業務独占』の意義は?, 「第 29 回 DLP フォーラム」(特別講演)(2013.12.7. 京都)

都賀谷紀宏: 歯科レーザー溶接のビームパラメータ設定の基礎, 「歯科レーザープロセッシングフォーラム 15 周年記念講演会」(2014.11.15. 横浜)

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、多細胞組織・器官の形態形成、リモデリングによる機能的適応などにみられる階層的な生命システム動態の理解を目指し、力学・数理学の観点から融合的研究を進めている。例えば、細胞が分子レベルで力学情報を感知し、その情報を細胞の活動に結びつけるメカニズムの解明、および、その結果としてマクロに現れ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を理解するため、細胞・分子レベルにおけるミクロな要素過程の解明とそれらが形成するシステムとしてのふるまいの理解を目指している。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、さまざまな力学を基礎として、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) 残留応力と能動的応力を考慮した動脈血管壁の力学モデリングと有限要素解析

動脈の生理機能評価や病態発生予測に力学的な観点から寄与することを目的として、動脈壁内に存在する残留応力及び血管平滑筋による能動的応力を考慮した動脈壁のモデルを新たに構築した。これらは、内的かつ能動的な応力であり、動脈血管壁のような不静定な構造を持つ厚肉の壁内において、応力調整に重要な役割を果たすことが予想される。また、このモデルに対して非線形有限要素法を用いた動脈壁の力学場の数値解析を行うことで、残留応力及び能動的応力が動脈の生理機能や病態発生機序に与える力学的影響を定量的に示した。このモデルを用いた数

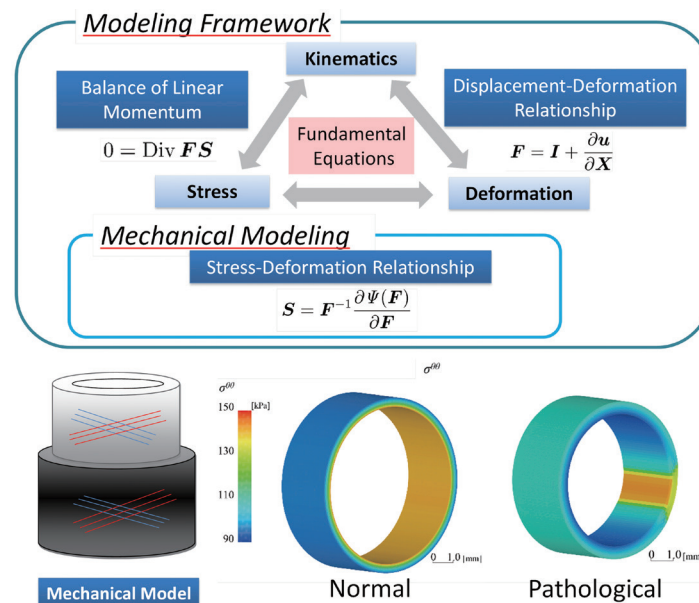


Fig. 1 残留応力と能動的応力を考慮した動脈血管壁の解析
Mechanical analysis for an arterial wall with residual and active stresses

値解析により、残留応力及び能動的応力の以下の力学的効果を明らかにすることができた。(i)残留応力は、血圧の大きさに関係なく動脈壁の円周方向応力勾配を減少させる。(ii)能動的応力は、正常血圧時に動脈壁の円周方向応力分布を均一化させるが、この均一化作用は、高血圧時に破綻する。(iii)能動的応力の存在は、相対的に残留応力の影響を弱める。これらの結果から、動脈の生理機能や病態発生機序には、能動的応力が支配的に働き、残留応力は能動的応力が存在しない状況において効果が現れるものと考えられた。本研究で構築した動脈壁のモデルを用いた力学場の数値解析は、今後、動脈疾患の病態発生予測や診断治療などに有用な力学情報を提供するものと思われる。

(2) 上皮組織の面外変形における頂端収縮する細胞の空間的パターンの役割

立体的器官の形成には、発生過程における2次元的上皮シートの面外変形が必要不可欠となる。典型的な面外変形である上皮シートの陥入は、細胞の頂端収縮によって引き起こされる。その頂端収縮する細胞の配置に関しては、組織内にランダムに存在するわけではなく、変形後に、適切な器官形状が生じるように、空間的パターンを呈している。本研究では、頂端収縮する細胞配置の空間的パターンが、上皮シートの面外変形方向をどのように決定するのかを示したものである。我々は、これまでに、形態形成における上皮組織変形をシミュレーションするための多細胞動態を表す数理モデルを構築してきた。本研究では、このモデルを用いて、頂端収縮する細胞配置の空間的パターンについて、(A)円形パターン、(B)輪状パターンの2種類のシミュレーションを行い、面外変形の比較を行った。両パターンともに、円状であるが、トポロジーに関しては、互いに異なっている。シミュレーション結果から、パターンAでは、上皮組織は基底側に押されるよう面外変形する陥入が生じること、パターンBでは、陥入とは面外変形方向が逆向きとなる膨出が生じることが示された。空間的パターンの違いにより、面外変形の方法が変化した機構を検討するため、細胞形状について詳しく解析したところ、空間的パターンの境界領域に存在する頂端収縮する細胞とその隣接する頂端収縮しない細胞の形状が面外変形の方法決定には重要であること、また、これら細胞形状は、空間的パターンにおける細胞間の力の釣り合いから決定されることが示された。

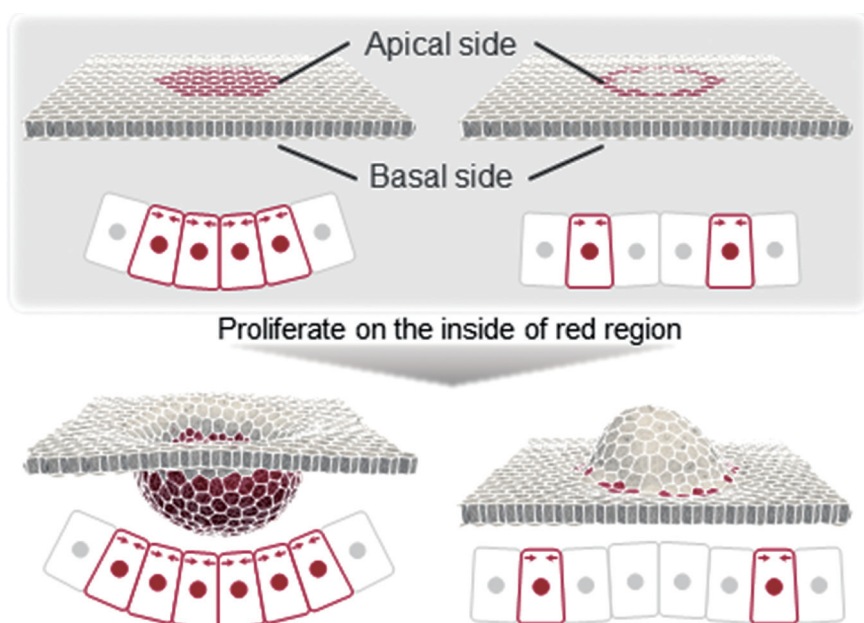


Fig. 2 : 上皮シートの面外変形シミュレーション
Simulation of out-of-plane deformation of epithelial sheet

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) Formulation and analysis for an arterial wall with residual and active stresses

In this study, for predicting arterial function and pathogenesis from a mechanical viewpoint, we develop a continuum mechanical model of an arterial wall that embodies residual and active stresses following a traditional anisotropic passive constitutive law. The residual and active stresses are incorporated into finite element methods based on a two-field variational principle described in the Lagrangian form. The linearisation of nonlinear weak-form equations derived from this variational principle is then described for developing an original finite element algorithm. Numerical simulations reveal the following : (i) residual stresses lead to a reduction in stress gradient regardless of the magnitude of external load ; (ii) active stresses help homogenise stress distribution under physiological external load, but this homogeneity collapses under pathological external load ; (iii) when residual and active stresses act together, the effect of the residual stresses is relatively obscured by that of the active stresses. We conclude that residual stresses have minor but persistent mechanical effects on the arterial wall under both physiological and pathological external loads ; active stresses play an important role in the physiological functions and pathogenesis of arteries, and the mechanical effect of residual stresses is dependent on the presence/absence of active stresses.

(2) Role of spatial pattern of contracting cells in out-of-plane deformation of epithelial tissue

Out-of-plane deformations are indispensable for generating three-dimensional tissue shapes from a two-dimensional epithelial sheet. Tissue invagination, a typical out-of-plane deformation, is induced by the contracting apical side of cell by apical constriction ; however, the contracting cells are not located at random within tissue but are located in a spatial pattern to generate a certain tissue shape. In this study, by focusing on the invagination, we show how the spatial patterns of the contracting cells in tissue determine the direction of out-of-plane deformation of the epithelial sheet. We constructed a mathematical model expressing the multicellular dynamics to analyze large deformation in epithelial tissue morphogenesis. Using this model, we tested two spatial patterns : contracting cells located (A) in a circle or (B) along the perimeter of the circle. Both spatial patterns are apparently the same, but topologically different. Our simulation results showed that spatial pattern A induced invagination, in which the epithelial sheet pushed toward the basal side while pattern B induced an evagination, the reverse direction of the invagination. We found that cell shapes at the boundary between the contracting and non-contracting cells are important in the determination of the direction of the out-of-plane deformation, and these cell shapes are determined by a force balance among cells in the spatial patterns of contracting cells

【業績目録】

◆ 誌上発表 ◆

1) 原著論文

- Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi : β -Catenin as a Tension Transmitter Revealed by AFM Nanomechanical Testing. Cellular and Molecular Bioengineering, in press.
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai : Vertex Dynamics Simulations of Viscosity-dependent Deformation during Tissue Morphogenesis. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, in press.
- Naoki Kida, Taiji Adachi : Finite Element Formulation and Analysis for an Arterial Wall with Residual and Active Stresses. Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, in press.
- Sung-Woong Han, Takato Tamaki, Taiji Adachi : A Novel Osteoblast/Osteocyte Selection Method in Primary Isolated Chick Bone Cells by Atomic Force Microscopy. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, in press.
- Sung-Woong Han, Kyouhei Morita, Taiji Adachi : A Novel Graphene Oxide-based Protein Interaction Measurement Using Atomic Force Microscopy. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, in press.
- Hiromi Miyoshi, Taiji Adachi : Topography Design Concept of a Tissue Engineering Scaffold for Controlling Cell Function and Fate through Actin Cytoskeletal Modulation. Tissue Engineering – Part B, 20-6 : 609-627 (2014-12)
- Sakae Tanaka, Taiji Adachi, Tatsuhiko Kuroda, Toshitaka Nakamura, Masataka Shiraki, Toshitsugu Sugimoto, Yasuhiro Takeuchi, Mitsuru Saito, John P. Bilezikian : New Simulation Model for Bone Formation Markers in Osteoporosis Patients Treated with Once-weekly Teriparatide. Bone Research, 2 : No.14043(2014-12)
- Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Taiji Adachi : Evaluation of Actin Curvature Dependent Actin-Arp2/3 Interaction Change Using AFM and Graphene Oxide Sheets. Science of Advanced Materials, 6-11 : 2453-2458(2014-11)
- Tsuyoshi Hirashima : Pattern Formation of an Epithelial Tubule by Mechanical Instability during Epididymal Development. Cell Reports, 9-3 : 866-873(2014-11)
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi : Modeling Trabecular Bone Adaptation to Local Bending Load Regulated by Mechanosensing Osteocytes. Acta Mechanica, 225-10 : 2833-2840(2014-10)
- Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi : Interstitial Fluid Flow in Canaliculi as a Mechanical Stimulus for Cancellous Bone Remodeling : In silico Validation. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 13-4 : 851-860(2014-8)
- Sung-Woong Han, Kyohei Morita, Patrice 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, 14-8 : 5654-5657(2014-8)
- Naoki Kida, Taiji Adachi : Numerical Analysis of Arterial Contraction Regulated by Smooth Muscle Stretch and Intracellular Calcium Ion Concentration. Journal of Biomechanical Science and Engineering, 9-1 : JBSE0002 (2014-2)
- Sung-Woong Han, Chikashi Nakamura, Jun Miyake, Sang-Mok Chang, Taiji Adachi : Single-Cell Manipulation and DNA Delivery Technology Using Atomic Force Microscopy and Nanoneedle. Journal of Nanoscience and

Nanotechnology, (Review Paper), 14-1: 57-70(2014-1)

2) 著 書

- 坪田健一, 安達泰治(分担執筆): 9-4 大規模ボクセル有限要素モデルを用いたヒト大腿骨近位部の海綿骨リモデリングシミュレーション: Wolff の法則の理解に向けて, pp. 235-236, In: バイオマテリアル研究の最前線(編集責任: 成島尚之, 中野貴由), 日本金属学会(2014-10)
- 亀尾佳貴, 安達泰治(分担執筆): 9-7 骨小腔 - 骨細管形態を考慮した骨梁透水係数の推定, pp. 241-242, In: バイオマテリアル研究の最前線(編集責任: 成島尚之, 中野貴由), 日本金属学会(2014-10)
- 安達泰治(分担執筆): 9-8 骨再生シミュレーションによる多孔質スキャフォールドの微視構造最適設計, pp. 248-249, In: バイオマテリアル研究の最前線(編集責任: 成島尚之, 中野貴由), 日本金属学会(2014-10)
- 安達泰治(分担執筆): 第1部, 第4章骨リモデリングの数理バイオメカニクス, pp. 100-106, In: 骨代謝つくり, 壊し, 変える - そのメカニズムと最新治療(編: 田中栄), 実験医学増刊, Vol. 32, No. 7, 羊土社(2014-5)
- 奥田 覚, 井上康博, 安達泰治(分担執筆): 多細胞のダイナミクスに基づいた3次元組織形成シミュレーション, pp. 343-347, In: 細胞の3次元組織化 - その最先端技術と材料技術 - 再生医療とその支援分野(細胞研究, 創薬研究)への応用と発展のために(遺伝子医学 MOOK 別冊)(編: 田畑泰彦), メディカルドゥ(2014-2)

3) 総 説

- 井上康博, 安達泰治: 多細胞システムのダイナミクス, 特集: 生命動態システム科学, 生体の科学, Vol. 65, No. 5, pp. 466-467, 医学書院(2014-10)
- 牧功一郎, 韓 成雄, 安達泰治: AFM でメカノセンサー 1 分子を釣り上げる, 細胞工学, Vol. 33, No. 9, pp. 917-921, 秀潤社(2014-9)
- 三好洋美, 安達泰治: マルチスケール解析で明らかにした細胞変形の時空間特性, 生物物理, Vol. 54, No. 4(314 号), pp. 221-225, 日本生物物理学会(2014-8)
- 竹中健太郎, 安達泰治: 骨リモデリングの数理モデル, 整形・災害外科, Vol. 57, No. 2, pp. 203-208, 金原出版(2014-2)
- 奥田 覚, 井上康博, 安達泰治: 多細胞の形作りを理解するための力学シミュレーション, 生物物理, Vol. 54, No. 1(311 号), pp. 31-34, 日本生物物理学会(2014-1)

◆ 学会等の発表 ◆

1) 学会・研究会発表

- 藤井徹矢, 井上康博, 安達泰治: 張力作用下におけるコフィリン修飾アクチンフィラメントのコフィリン-アクチン間エネルギー, 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会(2014.1.11-12. 仙台)
- 藤本博志, 須長純子, 井上康博, 安達泰治: 力学刺激が mES 細胞分化に及ぼす影響: mRNA 発現量に基づく検討, 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会(2014.1.11-12. 仙台)
- 牧功一郎, 韓 成雄, 安達泰治: 張力作用下における α -カテニンのナノ力学挙動解析, 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会(2014.1.11-12. 仙台)
- 竹中健太郎, 井上康博, 安達泰治: シグナル伝達機構を考慮した皮質骨リモデリングシミュレーション, 日本機械

- 学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会(2014.1.11-12. 仙台)
- 三好洋美, 坪田健一, 保屋野貴匡, 安達泰治, 劉 浩: マウス白血球の移動運動における細胞表層の力学特性. 日本機械学会第 26 回バイオエンジニアリング講演会(2014.1.11-12. 仙台)
- 藤井徹矢, 井上康博, 安達泰治: 張力負荷条件下におけるコフィラクチンフィラメント内のコフィリン-アクチン間エネルギー解析. 数学・数理科学と諸科学・産業との協働によるイノベーション創出のための研究促進プログラム(数学協働プログラム)「生命ダイナミックスの数理とその応用」(2014.1.20-22. 東京)
- 三好洋美, 西村美紀, 菅原路子, 安達泰治, 山形 豊: 足場材料の幾何形状が細胞形態と低分子量 GTPase 活性に及ぼす効果の評価. 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都)
- 藤本博志, 須長純子, 井上康博, 安達泰治: 力学刺激負荷によるマウス ES 細胞分化過程の mRNA 発現量変化. 第 13 回日本再生医療学会総会(2014.3.4-6. 京都) (Poster)
- 山本隆太, 亀尾佳貴, 大多尾義弘, 石原正行, 上岡 寛, 安達泰治: 骨細管のイメージベースモデルを用いた骨細胞突起変形シミュレーション. 日本機械学会関西支部第 89 期定時総会講演会(2014.3.18-19. 大阪)
- Yasuhiro Inoue, Tetsuya Fujii, Yoshihiro Nakamura, Taiji Adachi: Energetic Transition Pathway for Cofilin-mediated Action Filament Severing. International Symposium on Mechanobiology(2014.5.20-23 Okayama)
- Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi: α -Catenin Switches Mechanotransduction “On” under Tensile Force-based on Single-molecule Force Spectroscopy Using AFM. International Symposium on Mechanobiology 2014(2014.5.20-23 Okayama)
- Yoshitake Kameo, Yoshihiro Ootao, Masayuki Ishihara, Hiroshi Kamioka, Taiji Adachi: Deformation Simulation of Osteocyte Process in Canaliculus Using Three-dimensional Image-based Model. International Symposium on Mechanobiology 2014(2014.5.20-23 Okayama)
- Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai: Vertex Dynamics Model for Simulating Multicellular Tissue Deformation during Developmental Morphogenesis. International Symposium on Mechanobiology 2014(2014.5.20-23 Okayama)
- Tetsuya Fujii, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Tensile Force Increases the cofilin-actin Interaction Energy in a Cofilactin Filament. International Symposium on Mechanobiology 2014(2014.5.20-23 Okayama)
- Tsuyoshi Hirashima: Pattern Formation of Epithelial Tube by Mechanical Instability in Murine Epididymal Development. 第 47 回日本発生生物学会年会(2014.5.27-30. 名古屋)
- 安達泰治, 竹中健太郎, 今井 桂, 井上康博: 骨梁・オステオン形態リモデリングの力学-生化学連成モデル. 第 37 回日本バイオレオロジー学会年会(2014.6.5-6. さいたま)
- Tsuyoshi Hirashima: Pattern Formation of Epithelial Tube by Mechanical Instability in Murine Epididymal Development. 第 66 回日本細胞生物学会大会(2014.6.11-13. 奈良)
- 小川貴史, 嶋吉隆夫, 木田直樹, 安達泰治, 松田哲也: メッシュ分割が左心室拍動連成シミュレーションに与える影響の調査. 第 53 回日本生体医工学会大会(2014.6.24-26. 仙台)
- Hiromi Miyoshi, Jong Soo Ko, Taiji Adachi, Yutaka Yamagata: Design Concept of Micro-grooved Surfaces for Cancer Cell Screening. 7th World Congress of Biomechanics(2014.7.6-11 Boston)
- Yasuhiro Inoue and Taiji Adachi: Catch-bond-assisted Dynamic Formation of Actomyosin Functional Structure. 7th World Congress of Biomechanics(2014.7.6-11 Boston)
- Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi: Nanomechanical Behaviors of α -Catenin under Tension as a

Mechanotransduction Switch Revealed by AFM Nanofishing. 7th World Congress of Biomechanics(2014.7.6-11 Boston)

Satoru Okuda, Yasuhiro Inoue, Mototsugu Eiraku, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai : Vertex dynamics simulation of multicellular morphodynamics with visco-elastic-plastic large deformation. 7th World Congress of Biomechanics (2014.7.6-11 Boston)

Tsuyoshi Hirashima : Pattern Formation of Epithelial Tubule by Mechanical Instability in Murine Epididymal Development : Observation, Modeling, and Verification. The Joint Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology and the Society for Mathematical Biology (JSMB/SMB2014) (2014.7.28-8.1 Osaka)

Yasuhiro Inoue and Taiji Adachi : Modeling and Simulation of Dynamic Tissue Deformation Emerging from an Autonomous Spatiotemporal Gene Expression Patter. The Fourth Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics(JSB2014) (2014.9.1-4 Mie)

Taiji Adachi, Koichiro Maki, Sung-Woong Han : AFM Nanofishing of Mechanosensitive Molecules at Adherens Junction. The Fourth Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics(JSB2014) (2014.9.1-4 Mie)

大戸康平, 井上康博, 安達泰治 : SMD シミュレーションによる α ヘリックス構造を有するタンパク質の引張り試験の条件検討. 日本機械学会 2014 年度年次大会 (2014.9.8-10. 東京)

渡辺惟史, 井上康博, 安達泰治 : 多細胞力学シミュレーションを用いた上皮組織変形に対するアピカル収縮と細胞増殖の寄与の検討. 日本機械学会 2014 年度年次大会 (2014.9.8-10. 東京)

田中孝明, 須長純子, 安達泰治 : mES 細胞由来の多細胞組織の形態形成における陥入現象の観察. 日本機械学会 2014 年度年次大会 (2014.9.8-10. 東京)

玉木嵩人, 韓 成雄, 安達泰治 : AFM を用いた Wnt シグナル受容体と調節因子の相互作用測定. 日本機械学会 2014 年度年次大会 (2014.9.8-10. 東京)

Hiromi Miyoshi, Jong Soo Ko, Taiji Adachi, Yutaka Yamagata : Microgrooved Surfaces to Control Cell Migration for Biotechnological and Medical Applications. The 1st Africa International Biotechnology and Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-cell Analysis(2014.9.10-12 Nairobi, Kenya)

Koichiro Maki, Sung-Woong Han, Taiji Adachi : Single-molecule Mechanical Unfolding of α -catenin as an Intercellular Mechanosensor. The 1st Africa International Biotechnology and Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-cell Analysis(2014.9.10-12 Nairobi, Kenya)

今井 桂, 安達泰治 : RANK/RANKL/OPG システムが骨梁の形態変化に及ぼす影響 : 数理バイオメカニクス. 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 25 回バイオフィロンティア講演会 (2014.10.3-4. 鳥取)

藤井宣成, 須長純子, 安達泰治 : ニワトリ胚頭蓋冠における骨細胞の形態変化. 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 25 回バイオフィロンティア講演会 (2014.10.3-4. 鳥取)

井上康博, 渡辺惟史, 安達泰治 : 上皮組織変形における頂端収縮する細胞の空間的パターンの役割. 日本機械学会マイクロ・ナノ工学部門第 6 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム (2014.10.20-22. 松江)

2) 講演・シンポジウム

Taiji Adachi : Structural Optimality in Bone : Modeling Osteocyte Network as a Mechanosensory System. 日本機械学会北海道支部バイオメカニクス懇話会第 15 回講演会, 北海道大学大学院工学研究院人間機械システム

デザイン部門特別講演会(2014.2.6. 札幌)(Special Lecture)

安達泰治：医工学における力学シミュレーション：骨リモデリングと再生．神戸市産業振興財団医工連携人材育成セミナー(2014.2.11. 京都)(Seminar)

安達泰治，井上康博：多細胞による組織のかたちづくり：数理バイオメカニクス．医工学フォーラム特別講演会2013(2014.2.26. 京都)(Forum)

安達泰治，奥田 覚，井上康博：多細胞組織の形態形成シミュレーション．第13回日本再生医療学会総会，シンポジウム：組織再生の力学的環境を考える(2014.3.4-6. 京都)(Symposium)

Taiji Adachi, Satoru Okuda, Tadashi Watanabe, Yasuhiro Inoue：Computational Biomechanics of Tissue Morphogenesis. CDB Symposium 2014: Regeneration of Organs: Programming and Self-Organization(2014.3.10-12 Kobe)(Symposium)

Taiji Adachi：Computer Simulation of Multicellular Dynamics in Tissue Morphogenesis Using a Reversible Network Reconnection Model. International Workshop on Multiscale Mechanobiology(2014.5.15-18 Hong Kong)(Workshop)(Invited Lecture)

Tsuyoshi Hirashima：On the Pattern Formation of Epithelial Tube Folding in Epididymal Development. International Symposium on Mechanobiology 2014(2014.5.20-23 Okayama)

安達泰治，竹中健太郎，井上康博：骨リモデリングの数理バイオメカニクス：骨代謝と骨形態．第34回日本骨形態計測学会，医歯工連携シンポジウム「画像イメージングと骨形態計測の接点」(2014.6.12-14. 札幌)(Symposium)

Taiji Adachi：Multiscale Modeling and Simulation of Bone Functional Adaptation by Remodeling：Based on Uniform Stress Hypothesis. 20th CISM-IUTAM International Summer School on Multiscale Mechanobiology of Bone Remodeling and Adaptation(2014.6.23-27 Udine, Italy)(Lecture)

Taiji Adachi：In vitro Study on Mechanosensing and Communication of Osteocytes：Calcium Response and Nitric Oxide Production Induced by Local Mechanical Stimulus. 20th CISM-IUTAM International Summer School on Multiscale Mechanobiology of Bone Remodeling and Adaptation(2014.6.23-27 Udine, Italy)(Lecture)

Taiji Adachi：Modeling Osteocyte Mechanosensing and Communication in Bone Adaptation：Continuum Modeling of Matrix Deformation and Lacuno-Canalicular Flow. 20th CISM-IUTAM International Summer School on Multiscale Mechanobiology of Bone Remodeling and Adaptation(2014.6.23-27 Udine, Italy)(Lecture)

Taiji Adachi：Modeling Spatiotemporal Regulation of Trabecular and Osteonal Remodeling：Microscopic Fluid Flow in Canalicula and Biochemical Signaling among Bone Cells. 20th CISM-IUTAM International Summer School on Multiscale Mechanobiology of Bone Remodeling and Adaptation(2014.6.23-27 Udine, Italy)(Lecture)

Taiji Adachi：Computer Simulation of Bone Remodeling and Regeneration for Porous Scaffold Design：Biomedical Application in Bone Tissue Engineering. 20th CISM-IUTAM International Summer School on Multiscale Mechanobiology of Bone Remodeling and Adaptation(2014.6.23-27 Udine, Italy)(Lecture)

Taiji Adachi：Multiscale Biomechanics of Structural and Functional Adaptation in Living Systems：第16回生命科学研究所シンポジウム(2014.7.1-2. 京都)(Symposium)

Taiji Adachi, Kentaro Takenaka, Yasuhiro Inoue：Modeling Spatio-temporal Regulation of Trabecular and Osteonal Bone Remodeling. Minisymposium：Multiscale Techniques in Biomechanics and Mechanobiology(by

- Ralph Muller, Peter Pivonka, Christian Hellmich, and Bert van Rietbergen), 7th World Congress of Biomechanics(2014.7.6-11 Boston) (Minisymposium)
- Taiji Adachi: Multiscale Modeling of Bone Functional Adaptation by Remodeling. Minisymposium: Multiscale Techniques in Biomechanics and Mechanobiology (by Marco Viceconti), 7th World Congress of Biomechanics(2014.7.6-11 Boston) (Minisymposium)
- Tsuyoshi Hirashima: Towards the Understanding of Tubule Morphogenesis -Imaging, Quantification and Modeling. 内藤カンファレンス, “Bioimaging – a paradigm shift for the life sciences” (2014.7.15-18 北海道) (Symposium)
- Taiji Adachi, Kentaro Takenaka, Yasuhiro Inoue: Modeling Mechanochemical Couplings in Trabecular and Osteonal Bone Remodeling. Minisymposium: Computational Bone Biomechanics, 11th World Congress on Computational Mechanics(WCCM-XI) and 5th European Conference on Computational Mechanics(ECCM-V) (2014.7.20-25 Barcelona, Spain) (Symposium)
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Self-organized Actomyosin Structures with the Aid of Catch-bond Behavior. Minisymposium: Biophysical modeling for cellular processes, The Joint Annual Meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology and the Society for Mathematical Biology (JSMB/SMB 2014) (2014.7.28-8.1 Osaka)
- Taiji Adachi, Koichiro Maki, Sung-Woong Han: Single-molecule Analysis of Adherens Junction-Mediated Mechanotransduction Using AFM. The 1st Africa International Biotechnology and Biomedical Conference and the 8th International Workshop on Approaches to Single-cell Analysis(2014.9.10-12 Nairobi, Kenya) (Workshop) (Invited Talk)
- Taiji Adachi: Computer Simulation of Trabecular and Osteonal Bone Remodeling. 1st Global Conference on Biomedical Engineering and 9th Asian Pacific Conference on Medical and Biological Engineering(GCBME2014 & APCMBE2014) (2014.10.9-12 Tainan, Taiwan) (Invited Lecture)
- Yasuhiro Inoue, Tadashi Watanabe, Taiji Adachi: Role of spatial pattern of contracting cells in tissue invagination. The 62nd NIBB Conference Force in Development(2014.11.17-19 Okazaki) (Symposium)
- Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi: Mechanochemical coupling between tissue deformation and gene expression based on cell shape. MBI-Japan Joint Symposium on the Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics(2014.12.2-4 Singapore) (Symposium)

技 術 部

Division of Technical Support

【研究支援概要】

2014 年は 1 月より 12 月末までに 6 分野 141 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応えてきた。

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 Kossas method, Silver-stain)

2011 年より 実験病理指導認定士として関西にある病院、製薬研究所等、そして病理技術研究会などで技術指導を行ってきた。

4. 学術集会

京都大学ウイルス研究所
「ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点」
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」
合同学術講演会

開催日：2014 年 12 月 22 日(月)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会の挨拶 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所長)

座長：河本 宏(京都大学再生医科学研究所 教授)

「抗ウイルス自然免疫：RIG-I を見つけて 10 年」

藤田 尚志(京都大学ウイルス研究所 教授)

「自然リンパ球と炎症」

小安 重夫(理化学研究所総合生命医科学研究センター センター長)

「ボルナウイルス研究から探るウイルス－宿主共進化」

朝長 啓造(京都大学ウイルス研究所 教授)

ポスターセッション

座長：米原 伸(京都大学ウイルス研究所 教授)

「ヒト多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)の再生医療と創薬への実用化に必要な技術開発：大量培養法と化合物による分化誘導」

中辻 憲夫(京都大学再生医科学研究所 教授)

「タイトジャンクション(TJ)・アピカル複合体による生体機能システム制御と組織構築」

月田早智子(大阪大学大学院生命機能研究科/医学系研究科 教授)

「メディカルデバイスの開発から再生医療へ」

岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所 所長・教授)

閉会の挨拶 小柳 義夫(京都大学ウイルス研究所長)

ポスターセッション

【ウイルス研究所】

- P-1 水野 慎也 (がん遺伝子研究分野 秋山研究室)
大腸菌の膜内切断プロテアーゼ RseP の選択的基質認識・切断機構の解析
- P-2 鈴木 完 (情報高分子化学研究分野 大野研究室)
ショウジョウバエにおける RNA polymerase II 転写産物の仕分け機構の解析
- P-3 石橋 理基 (構造形成学研究分野 豊島研究室)
マウス ES 細胞の非対称分裂による中胚葉と内胚葉への運命決定機構の解析
- P-4 小林久美子 (増殖制御学研究分野 影山研究室)
分節時計遺伝子の発現可視化と同時メカニズムの解明
- P-5 阪口 翔太 (生体発がん機構研究分野 米原研究室)
IFN- γ によって誘導されるネクローシスの分子機構解析
- P-6 渡邊 丈治 (細胞制御研究分野 杉田研究室)
脂質特異的 T 細胞サブセットの同定
- P-7 設楽宗一郎 (生体防御研究分野 生田研究室)
Evidence for the thymic origin of $\gamma\delta$ IEL
- P-8 若林 敦子 (感染防御研究分野 竹内研究室)
Critical roles of TANK in the control of Pristane-induced pulmonary hemorrhage
- P-9 山田辰太郎 (分子遺伝学研究分野 藤田研究室)
SFTS ウイルス非構造タンパク質による自然免疫抑制機構の解明
- P-10 長谷川 輝 (ヒトがんウイルス研究分野 土方研究室)
一価不飽和脂肪酸合成は HCV ゲノム複製に重要な役割を有する
- P-11 橋本 暁 (信号伝達学研究分野 宮沢研究室)
感染性内在性レトロウイルス測定法の比較
- P-12 渡部 祐司 (霊長類モデル研究領域 三浦研究室)
高病原性 SHIV 感染サルにおける感染マクロファージは、SIV 感染サルの感染リンパ球と同程度の半減期を示す
- P-13 鈴木 紗織 (進化ウイルス研究領域 明里研究室)
GBV-B 感染マーマーモセット/タマリンにおける慢性化移行には液性免疫応答の遅延が関与する
- P-14 水戸部悠一 (ウイルス制御研究領域 松岡研究室)
HTLV-1 bZIP factor (HBZ) RNA のアポトーシス抑制作用
- P-15 金村 優香 (ウイルス病態研究領域 小柳研究室)
ゲノム編集法によるヒト T 細胞の HIV 関連細胞遺伝子の部位特異的ノックアウトと点変異導入

【再生医科学研究所】

- P-16 細川 暢子 (細胞機能調節学分野 細川研究室)
小胞体関連分解を担うユビキチンリガー複合体の機能解析
- P-17 山崎 正幸 (細胞機能調節学分野 細川研究室)
アンチトリプシンの不安定な凝集体構造とその毒性
- P-18 ○齊藤高志・谷郷智美・村上政広・北郷明成・松崎時夫・田畑泰彦 (生体材料学分野 田畑研究室)
低分子量薬徐放化のためのゼラチンハイドロゲル創製
- P-19 ○城潤一郎・永田純平・松井誠・山本雅哉・田畑泰彦 (生体材料学分野 田畑研究室)
バイオマテリアルを利用した物質の細胞内導入技術による細胞の生物機能改変
- P-20 庄子 栄美 (再生増殖制御学分野 瀬原研究室)
Developing cellular evaluation system for effective therapeutics against Duchenne muscular dystrophy using patient-derived induced pluripotent stem cells
- P-21 尾松 芳樹 (生体システム制御学分野 長澤研究室)
造血幹細胞・前駆細胞と免疫細胞を維持するニッチの機能と形成機構の解析
- P-22 法邑 賢一・平芳 一法 (細胞機能調節学分野 平芳研究室)
RNA aptamer による転写複合体中因子の機能解析
- P-23 有馬 祐介 (組織修復材料学分野 岩田研究室)
支持脂質二重膜へ導入された単鎖 DNA-ポリエチレングリコール-脂質による細胞接着とその局在状態
- P-24 小長谷 周平 (組織修復材料学分野 岩田研究室)
マイクロウェル中での三次元凝集体培養によるヒト iPS 細胞から臍島細胞への分化誘導
- P-25 武田 匡史 (幹細胞分化制御研究分野 山下研究室)
iPS 細胞由来新規心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定
- P-26 幾野 毅 (幹細胞分化制御研究分野 山下研究室)
再生医療の実用化のためのヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からの血管内皮細胞分化誘導法

平成 26 年度 京都大学再生医科学研究所若手発表会

開催日：2014 年 12 月 22 日(月)
場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会挨拶 所長 岩田 博夫

前半のセッション

座長 齊藤 高志(田畑研)、尾松 芳樹(長澤研)

- O-01 ゼブラフィッシュを用いた chm1 遺伝子発現制御領域の in vivo スクリーニング
山下 寛 生体分子設計学分野(開研)
- O-02 実験と数理で明かす管のかたち作りの力学機構 ～精巣上体細管の発生を題材にして
平島 剛志 バイオメカニクス研究領域(安達研)
- O-03 膜分子が制御する心臓神経堤分化制御
荒井 宏行 再生増殖制御学分野(瀬原研)
- O-04 転写因子 Foxc1 は造血幹細胞・前駆細胞ニッチの形成と維持に必須である
清家 正成 生体システム制御学分野(長澤研)

後半のセッション

座長 清家 正成(長澤研)、城 潤一郎(田畑研)

- O-05 「健常人ドナーからの MART-1 特異的 T 細胞の再生」
永野 誠治 再生免疫学分野(河本研)
- O-06 Dual Release Technology for Tissue Regeneration
Yang-Hee Kim 生体材料学分野(田畑研)
- O-07 免疫細胞のシグナルアダプター分子 LAT は細胞膜直下の小胞膜で働く：1 分子追跡による解明
廣澤幸一郎 ナノバイオプロセス研究領域(楠見研)
- O-08 免疫シグナルアダプター分子 SLP-76 の複合体の形成と成長：1 分子追跡による解明
吉田 謙太 ナノバイオプロセス研究領域(楠見研)
- O-09 Quantitative control of artificial DNA-lipid-mediated cell-cell cohesion
Ian Torao Hoffecker 組織修復材料学分野(岩田研)

ポスター発表

- P-01 Exploration of ADAM12 in zebrafish: expression analysis and generation of knockout mutants.
徳増 雄大 再生増殖制御学分野(瀬原研)
- P-02 「Role of NK cells in immune reaction against allografts」
一瀬 大志 再生免疫学分野(河本研)
- P-03 線維芽細胞増殖因子担持ハイドロゲルにより皮下に作製した免疫寛容部位への脾臓移植
栞原 令 組織修復材料学分野(岩田研)
- P-04 「健常人ドナーからの MART-1 特異的 T 細胞の再生」
永野 誠治 再生免疫学分野(河本研)
- P-05 Development of a feeder- and xeno-free system for the differentiation of iPS cells towards T-lineage cells
KOLLER Nicole 再生免疫学分野(河本研)
- P-06 ヒト iPS 細胞から中胚葉細胞塊を介した側板中胚葉由来間葉系幹細胞の誘導
松永 一仁 組織再生応用分野(戸口田研)
- P-07 Segregation of $\gamma\delta$ T cell progenitors prior to TCR β chain gene rearrangement independently of TCR-mediated signal
河田 岳人 再生免疫学分野(河本研)

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 25 年度共同研究報告会

開催日：2014 年 3 月 12 日(水)
場 所：京都大学再生医科学研究所

開会挨拶

所長 岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

「キメラマウスを用いた概日リズム成立の階層縦断的解析」

八木田和弘 教授(京都府立医科大学大学院医学研究科)

「幹細胞の stemness 維持を司る新規分子の研究」

西 英一郎 特定准教授(京都大学医学部附属病院)

「RNA 編集酵素 ADAR1 による造血幹細胞増殖・分化制御機構の解明」

飯笹 久 助教(北海道大学遺伝子病制御研究所)

「非天然型三次元ニッチ形成に基づく脂肪幹細胞の機能制御に関する研究」

吉本敬太郎 准教授(東京大学大学院総合文化研究科)

「超薄膜でカプセル化した移植用細胞の免疫隔離能評価」

寺村 裕治 特任准教授(東京大学大学院工学系研究科)

「染色体立体構造網羅解析からの細胞特異性解読へのアプローチ」

神吉 康晴 特任助教(東京大学先端科学技術研究センター)

「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」

吉田 松生 教授(基礎生物学研究所)

「膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立」

大木理恵子 研究員(国立がん研究センター研究所)

「再生治癒過程における幹細胞動態の非侵襲的追跡を実現する細胞標識ナノプローブの開発」

青木伊知男 チームリーダー(放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター)

閉会挨拶

副所長 開 祐司(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
京都大学再生医科学研究所
公開シンポジウム

開催日：2014年5月13日(火)

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会挨拶

岩田 博夫(京都大学再生医科学研究所)

「細胞分析プラットフォームとしての二次元抗体ディスプレイ」

加藤 功一(広島大学大学院医歯薬保健学研究院)

「マウス ES 細胞のミュータジェネシス：点変異からゲノム再構成変異まで」

國府 力(大阪大学大学院医学系研究科)

「細胞分化に伴う体内時計の発生メカニズム」

八木田和弘(京都府立医科大学大学院医学研究科)

(特別講演)

「腸管幹細胞とそのニッチ」

佐藤 俊朗(慶應義塾大学医学部)

(特別講演)

「哺乳類の再生現象—毛の再生から四肢の再生へ—」

伊藤真由美(New York University School of Medicine)

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
京都大学再生医科学研究所
第9回 公開講演会

開催日：2014年7月19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

「万能細胞(ES/iPS 細胞)の再生医療と創薬への応用—世界の現状と実用化に必要な技術開発—」

中辻 憲夫(再生医科学研究所 教授)

「細胞の中でタンパク質が作られる—からだを支える細胞の仕組み—」

細川 暢子(再生医科学研究所 准教授)

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
2014. 1.10	武田 洋幸 (東京大学)	「纖毛と器官形成－メダカ変異体を用いた解析」	再生増殖制御学セミナー	再生増殖制御学分野
2014. 1.22	池川 志郎 (独立行政法人 理化学研究所 統合生命医科学研究センター 骨関節疾患研究チーム)	骨・関節疾患のゲノム解析－現状と課題	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
2014. 1.24	斉木 臣二 (順天堂大学大学神経学(脳神経内科))	神経変性疾患病態時におけるオートファジーの重要性－オートファジーをターゲットとした治療薬開発を中心に－	細胞機能調節学セミナー	細胞機能調節学分野
2014. 2. 4	上西 博英 (独立行政法人農業生物資源研究所 農業生物先端ゲノム 研究センター 家畜ゲノム研 究ユニット 兼 動物科学研究 領域 動物生体防御研究ユ ニット)	家畜動物ゲノムの解読から見えてくるもの ～免疫系を中心に～	細胞機能調節学セミナー	細胞機能調節学分野
2014. 2. 7	近藤 淳 (田辺三菱製薬(株)研究本部探 索研究所)	軟骨マトリックス成分のプロテオミクス	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
2014. 2.10	小守 壽文 (長崎大学大学院医歯薬学総 合研究科)	Runx2 遺伝子の転写制御機構	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
2014. 3. 3	鄭 雄一 (東京大学大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻)	骨軟骨の組織工学	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
2014. 3.13	Kenneth D. Poss (Duke University Medical Center)	「Mechanisms of heart regeneration in zebrafish」	再生増殖制御学セミナー	再生増殖制御学分野
2014. 4.17	眞 昌寛 (マサチューセッツ医科大学 ウースター校)	「セブラフィッシュの血管新生において Vegf シグナル依存的 ERK シグナルの活性化が血管細胞の独自性と挙動を制御する」	再生増殖制御学セミナー	再生増殖制御学分野
2014. 4.21	内田 光子 (Harvard University)	「意思決定のしくみの解明に向けて－ドーパミン制御機構の網羅的研究－」	再生増殖制御学セミナー	再生増殖制御学分野
2014. 4.22	Tsuyoshi Hirashima (京都大学再生医科学研究所)	Pattern Formation of Epithelial Tube by Mechanical Instability during Epididymal Development	第 16 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
2014. 7.25	湯本 法弘 (NYU Langone Medical Center)	「Neuromuscular Synapse Formation: Responding to Muscle-derived Retrograde Signals Regulating Presynaptic Differentiation」	再生増殖制御学セミナー	再生増殖制御学分野
2014. 8. 8	Dar-Bin Shieh (National Cheng Kung University College of Medicine and Hospital)	Translational Nanomedicine for Advanced Disease Management.	第 14 回 NMMS セミナー	組織修復材料学分野
2014. 9.19	Carl Peter Blobel (Weill Medical College of Cornell University)	「iRhoms1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM17-dependent EGFR signaling」	再生増殖制御学セミナー	再生増殖制御学分野
2014.10.24	Jörg W. Bartsch (University of Marburg, Germany)	「ADAM8 as a promising therapy target in neoplasias and inflammatory diseases」	再生増殖制御学セミナー	再生増殖制御学分野
2014.11.14	Ryo Sudo (慶應義塾大学)	Multiscale Liver and Vascular Tissue Engineering -Tissue engineering using conventional and microfluidic culture models	第 17 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
2014.11.18	西川 周一 (新潟大学大学院自然科学系 理学部)	多細胞体における小胞体分子シャペロンの機能解析：シロイヌナズナを用いたアプローチ	細胞機能調節学セミナー	細胞機能調節学分野

学術講演会・シンポジウム・研究会

(再生増殖制御学分野)

第 14 回日本抗加齢医学会総会

開 催 日：2014 年 6 月 8 日

開催場所：大阪国際会議場

第 66 回日本細胞生物学会大会

開 催 日：2014 年 6 月 12 日

開催場所：奈良県新公会堂 東大寺総合文化センター

The 2nd Kyoto University & National Taiwan University Symposium 2014 - Biology Session

開 催 日：2014 年 9 月 1 日

開催場所：京都大学再生医科学研究所

5. 共同研究

2013 年度共同研究報告(研究期間 2013 年 4 月～2014 年 3 月)

【キメラマウスを用いた概日リズム成立の階層縦断的解析】

○研究代表者：八木田和弘 教授(京都府立医科大学医学研究科)

再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄 教授(附属再生実験動物施設)

○研究経過及び研究成果：

我々は、概日時計の発生メカニズムの解明を目的として本共同研究を提案した。つまり、「概日リズム成立機構」を細胞－組織－個体の各階層を貫いた統合的解析手法で解き明かしていくことを目的としている。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、自律振動をはじめなのかは現在まで分かっていない。そのため、我々は、ルシフェラーゼを発光レポーターとして用い、発生及び発達過程における概日リズムの成立状況を時空間的にリアルタイム・イメージングできる系を構築している。

本共同研究では、特に発生工学的手法を駆使して、概日リズムをモニターできる発光レポーターを有した様々な遺伝子改変 ES 細胞株を用いてキメラマウスを作出し、その発生期及び発達期における細胞－組織－臓器の各レベルにおける長期間リアルタイム・イメージング解析を行った。

その結果、現在までに、1) マウス embryo を用いた個体発生における概日時計の細胞自律的発生についてキメラマウス胚を用いて解明、2) マウス大腿骨をモデルとした発達期間を通した超長期器官培養による概日時計イメージング法の確立、などの成果を上げた。さらに、細胞分化異常による概日時計成立機構の破綻メカニズムなどの解明を進めており、具体的な分子機序についても明らかになってきている。

さらに、本共同研究の枠組みの中で、新たなゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用い、概日時計発生異常と疾患との関連を統合的に解析するモデルマウスの作製系を構築した。これにより、今後、さらなる有機的な連携による共同研究へと発展していく基盤が整った。

○研究成果の公表

〈論文〉

1. Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Inokawa H, Horie K, **Yagita K***. An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2a as an endogenous clock regulator. *PLoS One*, 8, e67241, 2013 (*Corresponding author)
2. Tsuchiya Y, Minami Y, Umemura Y, Takahashi T, Watanabe H, Kondoh G, Matsushita T, **Yagita K**. Involvement of MeCP2 in the molecular and behavioral circadian rhythms in mice. (投稿予定)
3. Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N, **Yagita K***. Cell and Tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS Lett.*, 588, 459-465, 2014. (*Corresponding author)
4. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai Y, Oda R, Inokawa H, Kubo T, **Yagita K***. Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse ex vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular Cartilages and Growth Plates. *PLoS One*, 8, e78306, 2013 (*Corresponding author)
5. Koinuma S, Asakawa T, Nagano M, Furukawa K, Sujino M, Masumoto KH, Nakajima Y, Hashimoto S, **Yagita K**, Shigeyoshi Y. Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center. *Eur J Neurosci.* 38, 2832-41, 2013
6. Engelen E, Janssens RC, **Yagita K**, Smits VA, van der Horst GT, Tamanini F. Mammalian TIMELESS is involved in period determination and DNA damage-dependent phase advancing of the circadian clock. *PLoS One*, 8, e56623, 2013

〈学会発表〉

1. **Yagita K**, Circadian Clock: A cell-autonomous time-keeping system in our body. 6th Asia Oceania Conference of Photobiology, Sydney, 2013 (Invited speaker)

2. 八木田和弘, :「イメージング技術を用いた生体機能の Cutting Edge」, 関西実験動物研究会 30 周年記念大会, 京都, Dec. 6, 2013(シンポジスト)
3. 八木田和弘, :「ES 細胞を用いた概日時計の in vitro 再現と分化制御機構との関連」, 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, Dec. 5, 2013(ワークショップ講演・オーガナイザー)
4. 八木田和弘, :「MYC induced disruption of circadian clock development」, 第 86 回日本生化学会, 横浜, Sep. 11, 2013(シンポジスト・オーガナイザー)
5. 八木田和弘, :「体内時計はいつ動き出すか」, 第 14 回日本抗加齢医学会, 横浜, June. 30, 2013(シンポジスト・オーガナイザー)
6. 八木田和弘, :「ES cell-based in vitro evaluation system of circadian clock phenotypes in mammals」, 第 90 回日本生理学会大会, 東京, Mar. 27, 2013(シンポジスト・オーガナイザー)

【非天然型三次元ニッチ形成に基づく脂肪幹細胞の機能制御に関する研究】

○研究代表者：吉本敬太郎 准教授(東京大学大学院総合文化研究科)

再生医科学研究所共同研究者：山本 雅哉 准教授(生体材料学分野)

○研究経過及び研究成果：

三次元培養環境が ADSC の分化に与える影響を調査することを目的とし、マイクロパタンを用いた三次元培養系で形成される ADSC 細胞塊(スフェロイド)の脂肪細胞への分化挙動を調査した。その結果、分化誘導を行った系において、スフェロイドの脂肪前駆細胞および脂肪細胞マーカー両遺伝子の発現量は、単層よりも最大で約二分の一程度まで低いことが明らかとなった。また、非誘導時の脂肪前駆細胞マーカー遺伝子は単層培養の方が、一方、骨芽前駆細胞分化マーカーはスフェロイドの方が高く発現することが明らかとなった。以上の結果と Oil Red 染色による結果とを合わせて考察すると、マイクロパタン培養法で提供される三次元培養環境は、ADSC の骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化には不利な環境であることが明らかとなった。

○研究成果の公表

現在、上記成果をまとめた論文の投稿を準備中である。

【RNA 編集酵素 ADAR1 による造血幹細胞増殖・分化制御機構の解明】

○研究代表者：飯笹 久 助教(北海道大学遺伝子病制御研究所)

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：

A-to-I RNA 編集酵素 ADAR1 は、二本鎖 RNA のアデノシンをイノシンへと変換する酵素である。ADAR1 欠損マウスでは、IFN シグナルの活性化と造血幹細胞の低下が報告されている。しかしながら ADAR1 の欠損は、ファミリー遺伝子である ADAR2 の RNA 編集活性を上昇させることから、ADAR1 の造血幹細胞における作用には不明な点が多い。

本研究では、造血幹細胞における A-to-I RNA 編集酵素 ADAR1 の役割を明らかにするために、Long-term hematopoietic stem cell(LT-HSC)及び、Short-term hematopoietic stem cell(ST-HSC)における ADAR1 の基質である microRNA(miRNA)前駆体の RNA 編集及び、ADAR1 isoform の発現を解析した。8 週令の C57BL/6 マウスより LT-HSC 画分(CD34⁻, Flk2⁻, c-kit⁺, Sca1⁺, Linage⁻)及び、ST-HSC 画分(CD34⁺, Flk2⁻, c-kit⁺, Sca1⁺, Linage⁻)をセルソーターで分離し、また ADAR1 の基質であり血液系で発現が報告されている miRNA 前駆体(Let-7g, miR-27a, miR-99a, miR-99b, miR-151, miR-203, miR-376a, miR-376b, miR-379, miR-411, miR-423)及び、mRNA(CYFIP2, BLCAP, FLNA)を RT-PCR で増幅し、PCR 産物を直接シーケンスすることで、RNA 編集を確認した。陽性コントロールは、マウス大脳皮質を用いた。また、ADAR1 isoform(p110, p150)、ADAR2 の発現量は定量的 RT-PCR を用いて測定した。内部標準は β -actin を用いた。

その結果、miRNA 前駆体は miR-99a, miR-151 が ST-HSC にのみ発現し、RNA 編集活性は認められなかった。また、mRNA は FLNA が、LT-HSC, ST-HSC に発現していたが両サンプルともに RNA 編集活性は認められなかった。RNA 編集活性は、陽性コントロールである脳サンプルでは認められた。また、脳と比較したところ先の ADAR1 欠損マウスにおける造血幹細胞の論文と異なり、LT-HSC に高い ADAR1p110 の発現(脳の 50 倍)が認められ、ST-HSC において IFN 誘導性の ADAR1p150 の高発現(脳の 15 倍)が認められた。ADAR1 が miRNA 産生酵素 Dicer と複合体を形成すると RNA 編集活性が低下することから(研

究成果論文1), これらの結果は脳などの組織と異なり, 造血幹細胞において ADAR1 が Dicer と複合体を形成している可能性を示唆している。現在詳細な解析を行なっている。

また, ADAR1 はマウス体組織幹細胞に重要なことが示唆されていることから, 癌幹細胞においても重要である可能性を考え, 同様な解析をヒト癌細胞株についても行なった。その結果, ヒト悪性中皮腫細胞株 TCC-Meso-1 では, siRNA による ADAR1 発現抑制 (siADAR1) は細胞増殖を抑制しなかったが, siADAR2 は細胞増殖, 接着, 浸潤を強く抑制した。同様な活性は, RNA 結合能を有さないドミナントネガティブ体の発現でも認められたが, RNA 編集活性欠損型の発現では認められなかった。同様な結果は, ヒト子宮頸癌 HeLa においても認められた。また悪性中皮腫細胞株では, ADAR2 の基質ではタンパク質輸送に関わる COPA 遺伝子しか発現していなかったが, COPA の過剰発現及び RNA 編集型 COPA の過剰発現は, がん細胞の増殖に影響を与えなかった。これらの結果は, ADAR2 は RNA 編集非依存的に細胞増殖を制御していることを示唆している。ADAR2 欠損マウスでは, 細胞増殖の異常は認められないことから, この現象は癌細胞に特有またはヒト細胞に特異的な現象と思われる。現在, miRNA に対する影響を解析中である (投稿準備中)。

ADAR1 の変異はヒトの皮膚病の原因となるが, マウスではこのような表現型は認められない (未発表データ)。これらの結果は, 二本鎖 RNA 編集酵素 ADAR は編集活性非依存的な作用を有し, またその作用には種差が存在することを示している。ADAR は二本鎖 RNA に結合することから, miRNA 前駆体のみならずヒト特異的繰り返し配列 (Alu) の影響についても解析中である。

○研究成果の公表

1. Ota H, Sakurai M, Gupta, R, Valente L, Wulff B-E, Ariyoshi K, Iizasa H, Davuluri RV, Nishikura K. ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing. *Cell* **153** (3): 578-589 (2013).
- ☆RNA 編集酵素 ADAR1 が miRNA 産生酵素 Dicer とヘテロダイマーを形成し, RNA 編集活性非依存的に Dicer を活性化することで, miRNA の産生を制御していることを明らかにした。
2. Liang S, Furuhashi M, Nakane R, Nakazawa S, Goudarzi H, Hamada J, Iizasa H. Isolation and characterization of human breast cancer cells with SOX2 promoter activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **437** (2): 205-211 (2013).
3. Goudarzi H, Iizasa H, Furuhashi M, Nakazawa S, Nakane R, Liang S, Hida Y, Yanagihara K, Kubo T, Nakagawa K, Kobayashi M, Irimura T, Hamada J. Enhancement of *in vitro* cell motility and invasiveness of human malignant pleural mesothelioma cells through the HIF-1 α -MUC1 pathway. *Cancer Lett.* **339** (1): 82-92 (2013).
4. A-to-I RNA editing in mouse long-term and short-term hematopoietic stem cells. Liang S, Kawano M, Nishikura K, Sugiyama T, Nagasawa T, Iizasa H (投稿予定)
5. p54^{nrb}/NonO directly represses SOX2 expression by the regulation of SOX2 promoter activity in breast carcinoma cell lines. Liang S, Takahashi H, Hirose T, Kuramitsu Y, Nakamura K, Hatakeyama S, Hamada J, Iizasa H (投稿予定)
6. RNA editing enzyme ADAR2 regulates cell motility and proliferation in malignant pleural mesothelioma cell. Sakata K, Maeda K, Sakurai N, Nakazawa S, Liang S, Yanagihara K, Kubo T, Nishikura K, Hamada J, Iizasa H (投稿予定)

【神経・グリア細胞のライブイメージングによる神経回路形成とその維持機構の解明】

○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：

神経ネットワークの構築や維持には, 神経細胞だけでなく, グリア細胞や血管・ミクログリアなどが関与する。しかしながら, それらの細胞の実体・動態や相互作用の分子基盤は, 未だ未解明なところが多い。本研究において申請者はゼブラフィッシュを用いた遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法により, 様々なパターンで蛍光蛋白質 GFP あるいは Gal4 を発現するゼブラフィッシュを作製してきた。その中で本研究では神経系を構築する多様な細胞集団を可視化し, 新規の神経系支持細胞の同定・支持機構の解明を目指してきた。共同研究を行う瀬原グループは, 同定細胞の性質を増殖因子やプロテアーゼの働きと関連づけて明らかにすることとし, 共同研究を実施した。

これまでに 2 系統に関してトランスポゾン挿入部位の遺伝子を同定し, これらが同じファミリーに属する転写因子で, 神経組織の形成だけでなく血管形成に必須の役割を果たすことを見いだした。瀬原と共同で, そのうちの 1 遺伝子のノックアウトマウスを作成し, その結果, 胎生致死をもたらすことがわかり, 現在のその表現型の解析を進めている。(未発表)。また, 別の 1 系

統は、ErbB2 遺伝子のトラップラインで、脳神経系のグリア細胞を特異的にモニターできる。これに関しても、神経軸索とグリア細胞の相互作用に関する研究を進めている(未発表)。ここでは、脳の特異的領域でGal4を発現することにより領域特異的に蛍光タンパク質を発現できる系統を用いて、中脳の神経前駆細胞を可視化しその動態を調べることによって、増殖因子ニューレグリンの、脳形成におけるあらたな役割を見いだしたので、その研究について述べる(近日中に投稿予定)。

脊椎動物において3次元の脳組織が形成される際、神経幹細胞から神経前駆細胞が生じ、さらに分裂を終えた神経細胞が生ずるが、分裂を終えた神経細胞が産生・蓄積する仕組みの研究は、意外にも遅れている。加齢や疾病との関わりにおいても、その仕組みの理解は極めて重要であるが、特に細胞外環境・細胞間相互作用の関与については、神経幹細胞から神経前駆細胞産生にWnt, FGF, Notch シグナル等の関与が知られているに対し、そのあとの神経前駆細胞の増殖や神経細胞の分化にどのような分子機構が関わるのか、殆ど解明されていないのが現状であった。その理由には神経幹細胞から前駆細胞産生に多くの注目が集まっていることだけでなく、マウスやラットなどの哺乳類モデルでは、脳形成初期を生きた状態で可視化するのが困難であることが挙げられる。小型魚類を用いた研究の面白さ・強みは、脳形成の初期過程を生きたままイメージングできること、そしてそれを用いて新たな形態形成機構を解明できるところにある。本研究において我々は、脊椎動物の脳形成機構を探るため、ゼブラフィッシュ中脳視覚統合領域である視蓋の形成をモデルとして、この問題に取り組んだ。

神経前駆細胞特異的なプロモーター下でGal4VP16を発現するトランスジェニックライン Tg(-8.4neurog:Gal4VP16)の受精卵にプラスミド UAS:membGFP/H2A-RFP をインジェクトすると、これはGal4 特異的に膜型 GFP と核 RFP を可視化できるので、このプラスミドが少ない割合の細胞内で stochastic に発現する結果、ひとつの神経前駆細胞由来の細胞集団を膜 GFP/核 RFP でラベルすることができる。このやや複雑な系を用いることによって、中脳前駆細胞には、二つの分裂パターンがあることがわかった。ひとつは、脳室内の interkinetic migration のあと、脳室の apical 側で分裂するパターン(図1左)、および脳室の subbasal-領域で分裂するパターン(図1右)である。それらの分裂には連続性があり、神経細胞は、後者の分裂を経て生ずることが明らかとなった。

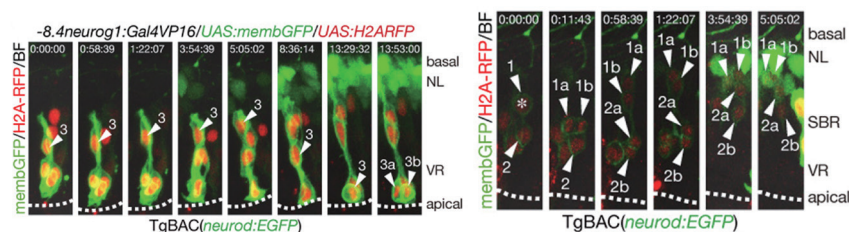


図 1

我々は、これらの分裂が、増殖因子ニューレグリン1のアイソフォームに依存することを見いだした。このニューレグリンのアイソフォームに対するアンチセンスモルフォリーノで卵を処理すると、apical 側の分裂は不完全に抑制され、subbasal 側の分裂はほぼ完全に抑制された(図2)。

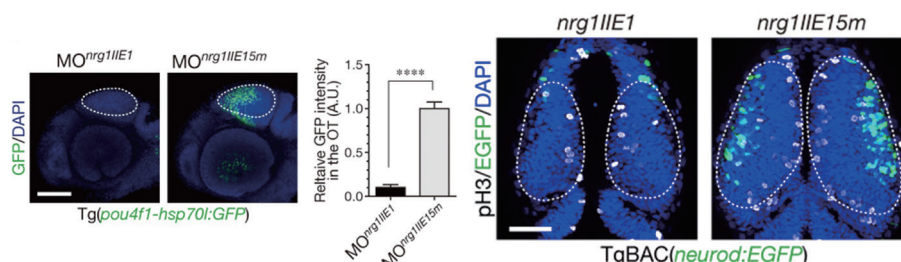


図 2 (左図：神経細胞産生抑制の表現型発生率と個体数……アンチセンスモルフォリーノ *nrg1l1e1* 0.57 ± 0.1 , $n = 94$; mis-sense オリゴ *nrg1l1e15m* 0.02 ± 0.023 , $n = 36$; 別のアンチセンス 0.79 ± 0.036 , $n = 104$, ミスセンスオリゴ 0.05 ± 0.047 。右図は、リン酸化ヒストンに対する抗体による染色結果を示す。)

問題は、後半の subbasal 領域での分裂が抑制されているのは、この分裂に対するモルフォリーノの直接的な効果なのか、それとも前半の apical 側での分裂が抑制された結果2次的に起こるものなのか、ということである。この問題を解決すべく、胚を一過的に ErbB インヒビター AG1478 に浸し、apical 側での分裂には殆ど影響を与えにくい条件を確立した。すなわち、apical 側の分裂には影響を与えずに subbasal 側の分裂を抑制することができ、その胚から、AG1478 を乗り除くと、再び apical 側の

分裂が回復する，という条件である(図3)．図3では，受精後26時間からAG1478に浸した胚を45時間胚の段階で洗い，発生させ，apical側のpH3陽性細胞数(白いバー)とsubbasal側の陽性細胞数(赤いバー)を48時間胚(AG1478を除いてから3時間後)と54時間胚(9時間後)とで調べたもので，subbasal側での細胞分裂がAG1478を取り除いてから数時間後に回復することを示している．またこのとき，apical側での細胞分裂には殆ど影響を与えていないことがわかる．つまり，apical側の細胞分裂において，AG1478に感受性をもつ発生時間は，約26時間(あるいは若干のタイムラグあったとしても約30時間)以前であることを意味する．

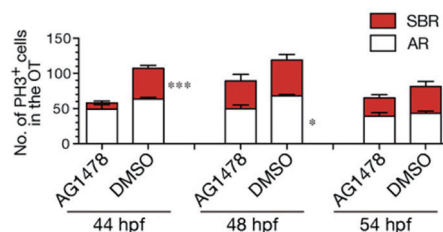


図3

次に，このような条件下で回復するsubbasal側の分裂に，apical側の分裂が先行するのか，あるいはapical側の分裂を経ずにsubbasal側の分裂が起こるのかどうかを検討した．その目的で，中脳幹細胞で特異的にGal4を発現するトラップラインSAGFF(LF)81Cを用いた．最終分化した神経が可視化されるTg(*pou4f1-hsp70l:GFP*)とSAGFF(LF)81Cをかけ合わせたトランスジェニックフィッシュTg(*pou4f1-hsp70l:GFP;SAGFF(LF)81C*)の受精卵に，プラスミドUAS:membGFP/UAS:mcherryをインジェクトし，上述のように一過的にAG1478で処理し，そしてそれを洗浄した．洗浄後のライブイメージングの結果，apical側での細胞分裂を経ることなしに，subbasal側の細胞分裂が再開することがわかり，このことから，神経を産み出す分裂自体がErbBシグナリングに依存していることが示唆された．

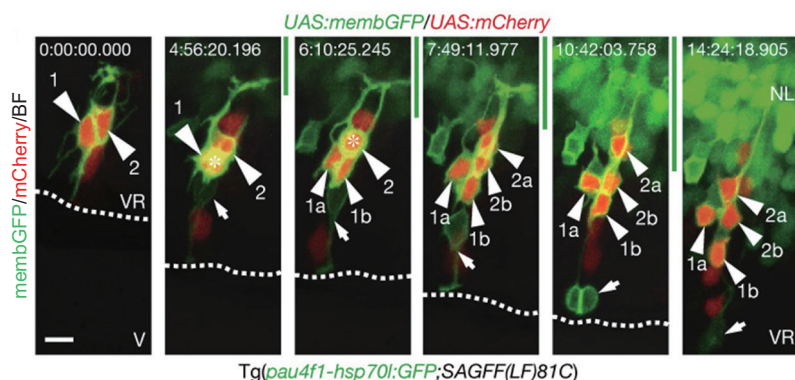


図4 (神経前駆細胞1, 2は，それぞれ分裂して神経細胞となる.)

これらの結果から，神経分化，特に神経前駆細胞から神経細胞が産生されるプロセスには，ErbBシグナリングが必要であることを明らかにした．

○研究成果の公表

Nakayama Y, Kikuta H, Kanai M, Yoshikawa K, Kawamura A, Kobayashi K, Wang Z, Khan A, Kawakami K, Yamasu K. (2013)

Gbx2 functions as a transcriptional repressor to regulate the specification and morphogenesis of the mid-hindbrain junction in a dosage- and stage-dependent manner. *Mech Dev.* 130(11-12), 532-52

Sittaramane V, Pan X, Glasco DM, Huang P, Gurung S, Bock A, Li S, Wang H, Kawakami K, Matise MP, Chandrasekhar A. (2013)

The PCP protein Vangl2 regulates migration of hindbrain motor neurons by acting in floor plate cells, and independently of cilia function. *Dev Biol.* 382(2), 400-12.

Kwon HB, Fukuhara S, Asakawa K, Ando K, Kashiwada T, Kawakami K, Hibi M, Kwon YG, Kim KW, Alitalo K, Mochizuki N.

(2013) The parallel growth of motoneuron axons with the dorsal aorta depends on Vegfc/Vegfr3 signaling in zebrafish. *Development* 140(19), 4081-90.

Satou C, Kimura Y, Hirata H, Suster ML, Kawakami K, Higashijima S. (2013) Transgenic tools to characterize neuronal properties

- of discrete populations of zebrafish neurons. *Development* 140(18), 3927-31.
- Wada H, Ghysen A, Asakawa K, Abe G, Ishitani T, Kawakami K. (2013) Wnt/Dkk negative feedback regulates sensory organ size in zebrafish. *Curr. Biol.* 23(16), 1559-65
- Kishimoto N, Asakawa K, Madelaine R, Blader P, Kawakami K, Sawamoto K. (2013) Interhemispheric asymmetry of olfactory input-dependent neuronal specification in the adult brain. *Nat Neurosci.* 16(7), 884-8.
- Wada H, Dambly-Chaudière C, Kawakami K, Ghysen A. (2013) Innervation is required for sense organ development in the lateral line system of adult zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(14), 5659-64.
- Yamanaka I, Miki M, Asakawa K, Kawakami K, Oda Y, Hirata H. (2013) Glycinergic transmission and postsynaptic activation of CaMKII are required for glycine receptor clustering in vivo. *Genes Cells.* 18(3), 211-24.
- Muto A, Ohkura M, Abe G, Nakai J, Kawakami K. (2013) Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Curr Biol.* 23(4), 307-11.
- Muto A, Kawakami K. (2013) Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Front Neural Circuits.* 7, 110.
- Asakawa K, Abe G, Kawakami K. (2013) Cellular dissection of the spinal cord motor column by BAC transgenesis and gene trapping in zebrafish. *Front Neural Circuits.* 7, 100.
- Banjo T, Grajcarek J, Yoshino D, Osada H, Miyasaka KY, Kida YS, Ueki Y, Nagayama K, Kawakami K, Matsumoto T, Sato M, Ogura T. (2013) Haemodynamically dependent valvulogenesis of zebrafish heart is mediated by flow-dependent expression of miR-21. *Nat Commun.* 4, 1978.
- Umeda K, Shoji W, Sakai S, Muto A, Kawakami K, Ishizuka T, Yawo H. (2013) Targeted expression of a chimeric channelrhodopsin in zebrafish under regulation of Gal4-UAS system. *Neurosci Res.* 75(1), 69-75.

【イオンチャネル遺伝子(HCN4)を指標とした洞房結節型再生心筋の分化誘導】

○研究代表者：鷹野 誠 教授(久留米大学医学部)

再生医科学研究所共同研究者：山下 潤 教授(幹細胞分化制御研究分野)

○研究経過及び研究成果：

心臓ペースメーカー特異的チャネル HCN4 遺伝子座に可視化プローブとしてホタル Luciferase をノックインしたマウスを作成し、一部の個体を京大動物実験センターに搬入した(京大側受け入れ担当：循環器内科、桑原宏一郎講師および神経生物学、中島則行助教)。

6/2-6/4：鷹野が京大に出張し、京大動物実験センターの in vivo 発光イメージング装置を借用して洞房結節や脳などにおける HCN4 の発現をルシフェラーゼ発光により確認し、所期の目的を達成した。

10/27-10/30, 11/29-30, 2014 年 1/14-1/15：鷹野が京大において上記のノックインマウスから皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作成した。しかしながら完成した iPS 細胞の増殖が遅く、再度 iPS 細胞を樹立する必要があると思われた。現在 Nanog-pyromycin 耐性遺伝子トランスジェニックマウスと、HCN4^{+/LucKI} を交配したダブルトランスジェニックマウスから線維芽細胞の培養を行っている。

1/20-22, 1/24-27, 1/30-31：久留米大学・助教の伊藤が京都大学へ出張し、ES 細胞から心筋細胞を分化誘導する技術の研修をおこない、所期の目的を達成した。

〈総括〉

iPS 細胞の樹立に手間取ったものの、研究全体は順調に進行した。今後は山下潤教授の指導を受けつつ、久留米大学において iPS 細胞の樹立と心筋分化誘導を実施する。

○研究成果の公表

1. Kuwabara Y, Kuwahara K, Takano M, Kinoshita H, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Igata S, Usami S, Minami T, Yamada Y, Nakao K, Yamada C, Shibata J, Nishikimi T, Ueshima K, Nakao K: Increased expression of HCN channels in the ventricular myocardium contributes to enhanced arrhythmicity in mouse failing hearts. *J Am Heart Assoc*, 2(3): e000150, 2013.
2. Oshita K, Itoh M, Hirashima S, Kuwabara Y, Ishihara K, Kuwahara K, Nakao K, Kimura T, Nakamura K, Ushijima K, Takano

M: Ectopic automaticity induced in ventricular myocytes by transgenic overexpression of HCN2. J Mol Cell Cardiol, 80, 81-89, 2015.

・その他の研究成果

1. 大下健輔, 井形幸代, 栗原佳宏, 桑原宏一郎, 鷹野 誠, 牛島一男: HCN2 過剰発現マウス心室筋のイソプロテレノール誘発自動能. 日本麻酔科学会第 60 回学術集会, 平成 25 年 5 月 23 日(札幌)
2. Oshita K, Igata S, Kuwabara Y, Kuwahara K, Ushijima K, Takano M: Induced automaticity in the ventricular myocytes of transgenic mouse overexpressing HCN2. IUPS 2013, July 23, 2013(Birmingham, UK)
3. ダニエルハーレル, 富永伊知子, 安部圭祐, 渡部太一, 荻ノ沢泰司, 安部治彦, 住友直方, 鶴野起久也, 鷹野 誠, 蒔田直昌: QT 短縮症候群患者に同定された新規 K⁺チャネル変異の電気生理学的特性と臨床像. 第 30 回日本心電学会学術集会, 平成 25 年 10 月 11 日(青森)
4. 大下健輔, 伊藤政之, 井形幸代, 栗原佳宏, 桑原宏一郎, 牛島一男, 鷹野 誠: 過分極誘発陽イオンチャネル(HCN2)の潜在的な不整脈性. 第 64 回西日本生理学会, 平成 25 年 10 月 18 日(北九州)
5. Igata S, Hayashi T, Itoh M, Takano M, Ishimatsu M: Lasting activity of alpha1-AR during postnatal development alters membrane properties of LC in SHR. Society for Neuroscience, 43rd Annual Meeting(Neuroscience 2013), November 11, 2013(San Diego)
6. 大下健輔, 伊藤政之, 井形幸代, 栗原佳宏, 桑原宏一郎, 牛島一男, 鷹野 誠: 過分極誘発陽イオンチャネル(HCN2)の潜在的な不整脈性. 第 23 回日本循環薬理学会, 平成 25 年 12 月 6 日(福岡)
7. Takano M, Ohshita K, Ito M, Ishihara K, Kuwahara K: Pathophysiological roles of HCN channel family in the heart. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014(Kagoshima)発表予定
8. Ishihara K, Itoh M, Igata S, Takano M: Functional consequences of a gain-of-function mutation in the Kir2.1 inward rectifier K⁺ channel associated with short QT syndrome. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014(Kagoshima)発表予定
9. Itoh M, Takano M: Identification of palmitoylation enzymes for the HCN2 channel. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014(Kagoshima)発表予定
10. Oshita K, Itoh M, Yanagi (Ishihara) K, Kuwabara Y, Kuwahara K, Ushijima K, Takano M: Induced automaticity in ventricular myocytes from transgenic mice overexpressing HCN2. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014(Kagoshima)発表予定
11. Takeya M, Itoh M, Ishihara K, Hayashi T, Nakamura K, Takano M: Epithelium of seminal vesicle modulates neural activity dependent contraction and originates stretch-sensitive contraction. The 91st Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, March 16, 2014(Kagoshima)発表予定

【腱・靱帯組織構築ならびにその機能維持における細胞外基質分子 fibulin-4 の役割解明】

○研究代表者: 佐々木隆子 助教(大分大学医学部)

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:

細胞外マトリックスタンパク質である fibulin-4 は, その欠失マウスの解析から弾性線維形成に必須であることが報告されている。この欠失マウスは生後 1 日目に大動脈または横隔膜破裂により死亡するが, その他にすべての欠失マウスで前肢拘縮(図 1)が観察される。本研究では, この点に着目し, fibulin-4 の腱・靱帯における役割の解明を目的とした。

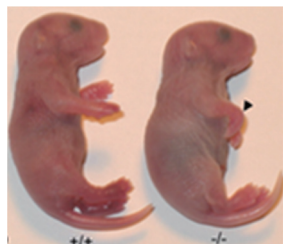


図 1 矢印で示すように欠失マウスでは拘縮が認められる

まず, *Fbln4* null マウスと腱・靱帯で GFP を発現するトランスジェニックマウス (*ScxGFP-Tg*) を交配し, 腱・靱帯の異常を容易に可視化できるようにした. 前肢を dorsal 側を蛍光顕微鏡下で観察すると, 新生マウスでは, 前肢の伸筋腱の切断が観察され(図 2), この異常は胎生期 17.5 日に始まり(図 3), 18.5 日ではすでに新生マウスと同様に伸筋腱の切断が認められた. この結果から, fibulin-4 は腱・靱帯の形成過程でなく, それらの機能保持に重要であることが示唆された.

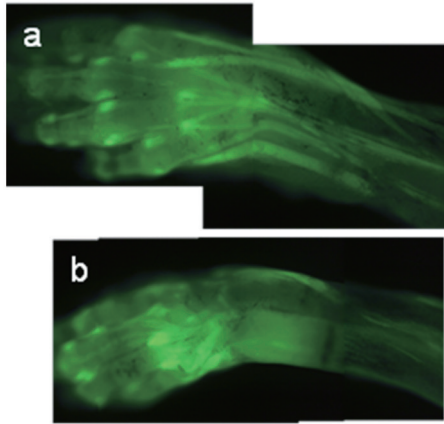


図 2 新生マウスの前肢の腱
a. *Fbln4* +/+
b. *Fbln4* -/-

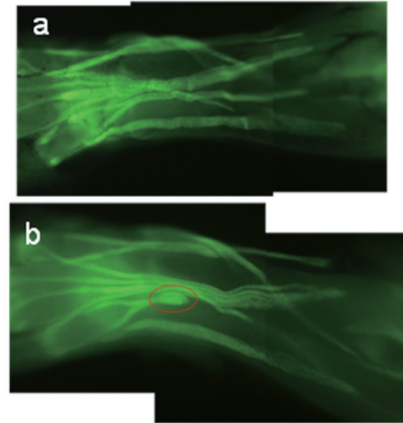


図 3 胎生期 17.5 日の前肢の腱
a. *Fbln4* +/+、b. *Fbln4* -/-
赤○のところで切断が観察される

さらに, 新生マウスの前肢関節横断切片を作製し GFP を観察すると, 図 4 に示すように, 比較的細い腱が確認不能であった.

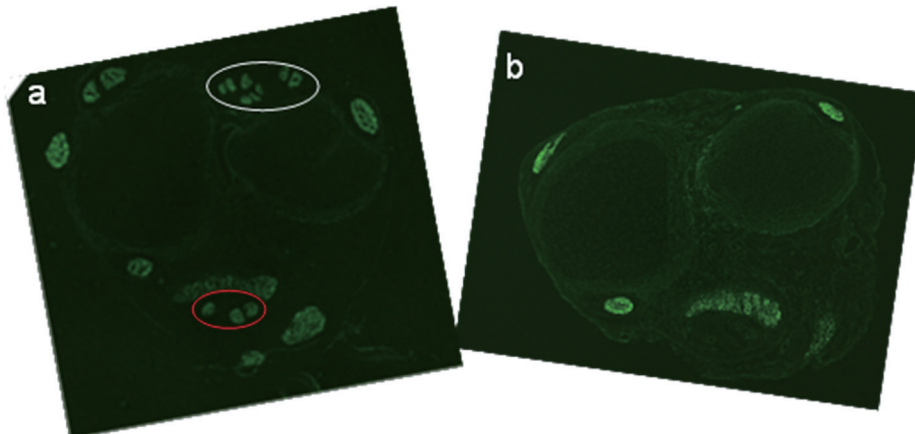


図 4 新生マウスの前肢横断切片での GFP の発現
a. *Fbln4* +/+、b. *Fbln4* -/-、図上が dorsal、図左が anterior.
白丸内は、Extensor Digitorum, Extensor Digiti, 赤丸内は、Flexor Digitorum

また, 前肢腱を電子顕微鏡で観察すると図 5 に見られるように, *Fbln4* +/- マウスの腱と比較すると異常が観察された. さらに, GFP が検出できない伸筋腱についても電顕で解析したが, 図 5 と同じような不規則なコラーゲン線維が観察された (data not shown).

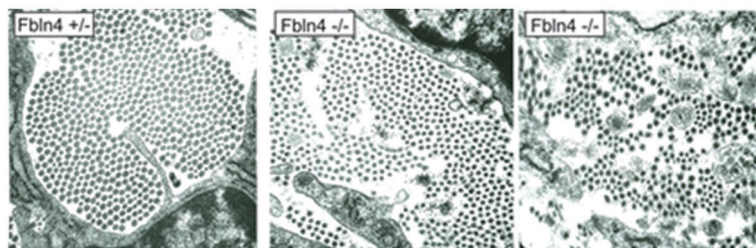


図 5 前肢腱の電子顕微鏡写真

今後、腱・靱帯特異的に fibulin-4 欠失マウスを用い、さらに解析を進めていく。

○研究成果の公表

さらに解析を進めてから、発表する予定である。

【膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 X の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立】

○研究代表者：大木理恵子 研究員(国立がん研究センター研究所)

再生医科学研究所共同研究者：角 昭一郎 准教授(器官形成応用分野)

○研究経過及び研究成果：

膵臓はその約 9 割以上は外分泌腺が占め、その中に内分泌細胞が集まる膵島が島のように浮かんで存在している組織である。膵島細胞が腫瘍化すると膵内分泌腫瘍となり、一方で膵島の機能が破綻し、インスリン分泌が異常になると糖尿病を発症する。糖尿病患者の治療として、膵臓移植より患者の体への負担が少ないという事で膵島移植が行われている。日本においては臓器提供者が少ないため、より高い膵島の生着率が望まれており、膵島細胞を増殖させる、あるいは膵島細胞の細胞死を抑制する方法が模索されている。

我々は、これまで機能未知であった遺伝子 X が、p53 によって誘導される遺伝子である事を見だし、X が p53 による Akt 抑制を担う重要な遺伝子である事を世界で初めて明らかにした。遺伝子 X は、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質(PIPs)との結合に働く PH ドメインのみから構成されるタンパク質をコードしている。一方、Akt も PH ドメインを持つタンパク質であり、活性化には PH ドメインを介して細胞膜に局在する事が必須である。X は、Akt のいわば内在的に発現する dominant negative 体として機能し、Akt と PIPs との結合を直接阻害する。その結果、Akt の細胞膜局在は阻害され、下流の生存シグナルは伝達されない。

がん抑制において、非常に強いがん化促進能を持つ Akt の活性を制御する事はとても重要である。実際に X の発現を抑制した細胞では Akt の異常な活性化が認められるとともに、細胞ががん化(足場非依存性の増殖能を獲得)している事が示され、X はがん抑制能を有する事が示された。さらに、ヒト肺及び膵内分泌腫瘍において遺伝子 X の高頻度な欠損が認められた。これらのがん組織では正常組織と比較して X の発現低下と Akt 活性の上昇が認められ、X が内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子として機能していると考えられた。

一方で、X が膵内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子であるという事から、X が膵内分泌細胞の増殖を制御するのではないかと考え研究を進めている。これまでに膵島 β 細胞由来の細胞株 RIN 細胞、正常膵島細胞を用いて、膵 β 細胞において X が細胞増殖と Akt 活性を抑制している事を明らかにした。

さらには X 欠損マウスにおいて膵島の過形成が認められており、X は膵島細胞の増殖を抑制する事が示された。

これまでに角昭一郎准教授との共同研究によって、分離膵島から得た膵島細胞を用い、X が膵島細胞において細胞増殖の抑制、アポトーシス誘導に機能する事を明らかにした。

今後さらに膵島機能に X がどのように関わるのか解析を進める事で、糖尿病研究、膵島移植に役立つ成果を得る事が可能である。さらには X 機能を抑制した膵島を作り出し、再生医療の分野に役立てたいと考えている。

追記：

* 報告書の提出後に文献 1 (in press) が公開された。論文題目・掲載情報は「**PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors**」, PNAS, 111 (23), E2404-E2413, 2014 である。

** 報告書提出時は知財の関係で遺伝子 X としているが、実際には遺伝子 X は PHLDA3 である。

○研究成果の公表

1. Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase³, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata* and Hitoshi Nakagama*. (*These authors equally contributed to the work) X is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors.
PNAS, in press.
2. Toshitsugu Fujita, Yoshinori Asano, Junko Ohtsuka, Yoko Takada, Kazunobu Saito, Rieko Ohki, Hodaka Fujii. Identification

- of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). Scientific Reports, 3, doi: 10.1038/srep03171.
3. Sakata N, Nicolas S, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Kodama T, Unno M. Enhanced Ultrasopnography using Nanobubble Contrast Agent for Islet Transplantation. (投稿予定)
 4. Development of polyvinyl alcohol bioartificial pancreas with rat islets and mesenchymal stem cells. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Sumi S, Goto M, Unno M. Transplant Proc. 2013; 45(5): 1875-80. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.01.043.
 5. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Aoki T, Mizuma M, Motoi F, Katayose Y, Kodama T, Egawa S, Unno M. Imaging of transplanted islets by positron emission tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasonography. Islets. 2013; 5(5). (Online)
 6. Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. Diabetes Metab Res Rev. 2014; 30(1): 1-10.
 7. Hata T, Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hayashi H, Motoi F, Goto M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Postoperative cholestasis and cholangitis after total pancreatectomy with biliary reconstruction impair the function of autotransplanted islets. Transplantation. 2013 Sep 15; 96(5): e40-3.
 8. Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M. Clinical experiences in the treatment of pancreatic arteriovenous malformation by total pancreatectomy with islet autotransplantation. Transplantation. 2013 Sep 15; 96(5): e38-40.

・その他の研究成果

〈招待講演〉

1. 日本遺伝学会第 85 回大会, ワークショップ発表, 2013 年 9 月
大木理恵子「遺伝子 X は神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である」
2. The 6th International p63/p73 Workshop, 2013 年 9 月
Rieko Ohki 'X'; a p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of endocrine tumors'
3. 大阪大学微生物病研究所, ゲノム生化学セミナー, 2013 年 12 月(発表予定)
大木理恵子「新規癌関連遺伝子の同定による癌化メカニズムの解明」

〈口頭発表〉

- 第 72 回日本癌学会学術総会, 口頭発表, 2013.10
大木理恵子「Akt の新規抑制因子をコードする遺伝子 X は内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である」

〈ポスター発表〉

1. 第 35 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2013.12
Akt 抑制遺伝子 X は膵β細胞の増殖を抑制する
斉藤 梢, 大木理恵子
2. 第 35 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2013.12
遺伝子 X と MEN1 遺伝子による膵内分泌腫瘍の抑制機構の解明
チン・ヨ, 大木理恵子
3. 第 35 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2013.12
がん抑制遺伝子 X による新規 Akt 抑制メカニズムの解明
西川雷羅, 大木理恵子
4. 第 35 回日本分子生物学会年会, ポスター発表, 2013.12
遺伝子 X は下垂体腫瘍の新規がん抑制遺伝子である
峯岸舞子, 大木理恵子

【超薄膜でカプセル化した移植用細胞の免疫隔離能評価】

○研究代表者：寺村裕治 特任准教授(東京大学大学院工学系研究科)

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：

コラゲナーゼ消化法により、マウス膵臓から膵島を分離して、数日間培養した後に実験に使用した。まずは、マレイミド基を有するポリエチレングリコール結合脂質(Mal-PEG 脂質)と分岐型 PEG 誘導体(4 分岐型 PEG-Mal と 8 分岐型 PEG-SH)を用いて、膵島表免疫の薄膜形成を試みた。共焦点レーザー顕微鏡による観察から、膵島表面にマイクロメートルレベルの膜厚を有する PEG からなる薄膜が形成できていることを明らかにした。ADP 分解酵素であるアピラーゼに蛍光標識(Alexa488)とチオール基をあらかじめ導入しており、薄膜に固定できる。血液適合性の評価に関しては、アピラーゼと同等の機能を有する CD39 の遺伝子組換え体を利用して行う。CD39 の遺伝子組換え体に蛍光標識とトラウト試薬を利用してチオール基を導入し、Mal-PEG 脂質により膵島表面への固定化を試みた。共焦点レーザー顕微鏡による観察から、膵島表面への固定化が確認できたことから、現在、ヒト血液を用いた血液適合性試験を進めている。また、糖尿病モデルマウスへの移植実験も進めている。

○研究成果の公表

〈論文〉

投稿準備中

〈学会発表〉

1. [依頼講演] 寺村裕治, PEG 脂質誘導体による細胞の表面修飾と膵島細胞移植への展開 第 13 回日本再生医療学会総会, 京都, 2014 年 3 月 4 日から 6 日
2. [依頼講演] 寺村裕治, PEG 脂質誘導体による細胞の表面修飾と膵島細胞移植への展開 第 10 回ナノメディシン分子科学セミナー, 東京, 2014 年 3 月 3 日
3. [依頼講演] 寺村裕治, 高分子による細胞の表面修飾と糖尿病治療を目指した細胞移植への展開 第 2 回日本バイマテリアル学会 北陸若手研究発表会, 富山, 2013 年 12 月 16 日
4. [受賞講演] 寺村裕治, PEG 脂質誘導体による膵島の表面修飾と移植免疫反応の制御 第 35 回日本バイマテリアル学会大会, 東京, 2013 年 11 月 25 日, 26 日
5. [口頭発表] Yuji Teramura Madoka Takai and Bo Nilsson, "A new approach to microencapsulation of pancreatic islets within stable ultra-thin membranes for cell transplantation", 14th World Congress of the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA 2013) in Monterey, USA, Sep 24-27, 2013.

【歯根膜における Scleraxis の発現制御と機能】

○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：

これまでに我々の研究グループは、腱・靱帯細胞の分化・成熟を制御している b-HLH 型の転写因子である Scleraxis(Scx)が歯根膜でも発現していることを見出している。また、Scx の発現を Green Fluorescent Protein(GFP)で可視化できる ScxGFP Tg マウスを樹立している。歯根膜におけるメカニカルストレスと Scx の関係を解析するために、ScxGFP Tg マウスを応用して歯に矯正力を負荷し、川本法を用いて非脱灰凍結切片を作製して観察した。その結果、歯根膜における Scx の発現は、牽引側で上昇し、圧迫側で低下していた。また、牽引側の歯根膜では、Scx の発現上昇に先立って、活性型 TGF- β の高い発現が誘導され、TGF- β 受容体のシグナル分子である Smad3 のリン酸化の亢進が認められた。従って Scx は歯根膜に負荷されるメカニカルストレスに応答性を示す転写因子であり、歯根膜における Scx の発現制御には TGF- β -Smad2/3 シグナリングが関与していることが示唆された。歯根膜細胞における Scx の発現制御メカニズムについて解析するために、ラットの抜去歯牙からのアウトグロース法によって得られた歯根膜細胞を培養し、各種の growth factor(GF)(TGF- β 2, BMP4, FGF2 および GDF5)を添加することにより、どの GF に反応して Scx の発現が上昇するのかを検討した。Scx の発現レベルの解析にはリアルタイム PCR を用いた。その結果、ラット培養歯根膜細胞では TGF- β 2 の添加により Scx の発現レベルが最も上昇することが明らかとなった。さらに、マウス歯根膜細胞由来の細胞株として樹立されている PDL-L2 においても同様の結果が得られた。

一方、歯根膜細胞での *Scx* の機能について検討するため、レンチウイルスを利用してラット培養歯根膜細胞において *Scx* の過剰発現を行い、石灰化誘導に対する反応性及び遺伝子発現の変化を解析した。石灰化誘導開始後 21 日目において培養細胞をアリザリンレッドで染色した結果、*Scx* を過剰発現した細胞では、コントロールと比較して顕著に石灰化が抑制されていた。更に培養 10 日目の歯根膜細胞における遺伝子発現を解析した結果、*Scx* の過剰発現により、*Osteocalcin* 及び *Osteopontin* の発現低下と、*Matrix Gla Protein* 及び *Periostin* の発現上昇が誘導された。

以上の結果から、牽引力に応答して発現上昇が誘導される *Scx* は、歯根膜の石灰化に対して抑制的に作用することにより、歯根膜の恒常性の維持に寄与していることが示唆された。

○研究成果の公表

〈論文〉

タイトル(仮)：Tensile force upregulates the expression of Scleraxis that has inhibitory action on mineralization of the periodontal ligament fibroblasts

著者(仮)：Aki Takimoto, Masayoshi Kawatsu, Yuki Sugimoto, Tadafumi Kawamoto, Masahiro Seiryu, Etsuko Ikeda, Teruko Takano-Yamamoto, Yuji Hiraki, and Chisa Shukunami

投稿予定：Stem Cells

タイトル(仮)：Expression of Scleraxis in the periodontal ligament during tooth movement in mice

著者(仮)：Masayoshi Kawatsu, Chisa Shukunami, Aki Takimoto, Masanari Iwasaki, Masahiro Seiryu, Etsuko Ikeda, Yuji Hiraki, and Teruko Takano-Yamamoto

投稿予定：Journal of Dental Research

・その他の研究成果

〈講演〉

- 1) 山本照子：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。2012.03.12, 京都, 平成 23 年度共同研究会「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」口演発表
- 2) 山本照子：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。2013.03.15, 京都, 平成 24 年度共同研究会「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」口演発表

〈国内の学会発表〉

- 1) 滝本 晶, 宿南知佐, 川津正慶, 清流正弘, 山本照子, 開 祐司：歯根膜における Scleraxis の発現とその制御 Regulation of Scleraxis expression in the periodontal ligament. 2012.07.19-21, 東京, 第 30 回日本骨代謝学会にて口演発表
- 2) 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。2012.09.14-15, 京都, 第 13 回運動器科学研究会にて口演発表
- 3) 川津正慶, 岩崎将也, 清流正弘, 池田悦子, 滝本 晶, 宿南知佐, 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 Functional analysis of Scleraxis in the periodontal ligament during experimental tooth movement. 2012.09.26-28, 盛岡, 第 71 回日本矯正歯科学会大会にて口演発表 学術大会優秀発表賞受賞
- 4) 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。2012.11.10, 京都, 第 9 回 Skeletal Research Meeting にて口演発表
- 5) 川津正慶, 岩崎将也, 清流正弘, 池田悦子, 滝本 晶, 宿南知佐, 山本照子：歯根膜細胞における伸展刺激に応答した Scleraxis 発現調節メカニズムの解析 Mechanical stretch increases Scleraxis expression in periodontal ligament cells via the TGF-beta signaling pathway. 2013.10.07-09, 松本, 第 72 回日本矯正歯科学会大会にてポスター発表

【幹細胞の stemness 維持を司る新規分子の研究】

○研究代表者：西 英一郎 特定准教授(京都大学医学部附属病院)

再生医科学研究所共同研究者：河本 宏 教授(再生免疫学分野)

○研究経過及び研究成果：

我々は、M16 ファミリーのメタロエンドペプチダーゼ nardilysin(NRDc)を、増殖因子 HB-EGF の受容体として同定し(Nishi 他 EMBOJ,2001), NRDc が ADAM プロテアーゼの活性化を介して HB-EGF の細胞外ドメインシエディングを増強すること、

NRDc のシェディング増強効果は HB-EGF に限定されず, TNF- α など広範な膜蛋白質に及ぶことを明らかにした(Nishi 他 JBC, 2006, Hiraoka 他 J. Neurochem, 2007 など). さらに NRDc 欠損マウスの解析より, NRDc がニューレギュリンのシェディングを介して神経軸索・髄鞘形成を司ること(Ohno 他 Nat. Neurosci. 2009), TNF- α のシェディングとその下流の IL-6 発現増強を介して胃がん進行に関わること(kanda 他 EMBO Mol Med 2012)を明らかにし, NRDc のシェディング調節因子として重要性を明らかにしてきた. 一方 NRDc が核内で修飾特異的(ジメチル H3K4)にヒストン H3 に結合し転写調節に関わっていること(Lin 他 JBC 2012), PGC-1 α と結合し, その転写コアクチベーター機能の調節を介して *in vivo* での適応熱産生を制御していることを明らかにし(Nat. Commun. 2014), NRDc が局在依存性に多機能を有することを明らかにした.

NRDc 欠損マウスを用いた予備的データは, 同分子が造血幹細胞の機能維持に重要である可能性を示唆した. また, 複数のマウスがんモデルにおいて NRDc 欠損マウスは著明な発がん抵抗性を呈した. 以上から, 本研究では造血およびがん幹細胞 stemness 維持における NRDc の役割を明らかにすることを目的とした. 今年度は, 血球系細胞および各臓器特異的に NRDc を欠損させることで, 造血および発がんにおける NRDc の臓器特異的役割を明らかにするため floxed マウスの作製に取り組み, 複数の臓器特異的 NRDc 欠損マウスの作出に成功した.

○研究成果の公表

〈論文〉

Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler S, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T and Nishi E*

Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing α -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model

Neurobiol Aging 35: 213-22, 2014.

doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.014.

Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen Po-Min, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T and Nishi E*

Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis

Nat. Commun. 5: 3224, 2014.

doi: 10.1038/ncomms4224

〈学会発表〉

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijyo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E.

Nardilysin is a critical regulator of insulin secretion and glucose metabolism

American Heart Association scientific sessions 2013. Nov 18(15-19), 2013, Dallas, USA.

Hiraoka Y, T. Matsuoka, M. Ohno, K. Nishi, K. Nakamura, K. Kita, T. Kimura and E. Nishi.

Critical roles of a metalloendopeptidase nardilysin in cold-induced adaptive thermogenesis

ASCB(American Society for Cell Biology), Dec 14-18, 2013, New Orleans, USA

Ohno M, Watanabe S, Hiraoka Y, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Kita T, Nishi E, Kimura T.

Nardilysin, an Activator of Ectodomain Shedding, is a Novel and Potent Biomarker for Acute Coronary Syndrome

(English session 最優秀賞)

第 115 回日本循環器学会近畿地方会(2013 年 6 月 15 日 京都)

大野美紀子, 平岡義範, 松浦 博, 西 清人, 西城さやか, 坂本二郎, 陳 博敏, 牧山 武, 北 徹, 木村 剛, 西英一郎

ナルディライジンによる心拍数制御機構

(学会奨励賞受賞)

第 18 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(2013 年 8 月 16-17 日, 大阪)

西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野美紀子, 中村和弘, 松村成暢, 西 清人, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西英一郎

体温恒常性維持におけるナルディライジンの役割

平成 25 年度 温熱生理研究会(2013 年 9 月 5-6 日, 岡崎)

西城さやか, 平岡義範, 松岡龍彦, 大野美紀子, 中村和弘, 松村成暢, 西 清人, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛, 西英一郎

ナルディライジンは PGC-1 α を制御することで体温恒常性維持機構と適応熱産生を調節する

第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3-6 日, 神戸)

西 清人, 佐藤雄一, 大野美紀子, 平岡義範, 西城さやか, 坂本二郎, 陳 博敏, 松岡龍彦, 北 徹, 稲垣暢也, 木村 剛, 西英一郎
ナルディラインジンはグルコース応答性インスリン分泌を制御する

第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3-6 日, 神戸)

大野美紀子, 平岡義範, Lichtenthaler Stefan F, 富本秀和, 荒木 互, 高橋良輔, 坂本二郎, 陳 博敏, 北 徹, 木村 剛,
西英一郎

アルツハイマー病におけるナルディライジンの意義

第 36 回日本分子生物学会年会(2013 年 12 月 3-6 日, 神戸)

Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E.

Nardylisin controls glucose metabolism through the regulation of insulin secretion

第 78 回日本循環器学会学術集会(2014 年 3 月 21 日, 東京)

Saijo S, Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen P, Kita T, Kimura T, Nishi E.

Nardylisin Regulates Adaptive Thermogenesis and Body Temperature Homeostasis through Modulation of PGC-1 α

第 78 回日本循環器学会総会(2014 年 3 月 23 日, 東京)

Sakamoto J, Chen PM, Saijo S, Nishi K, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E.

Nardylisin is Involved in Pressure Overload-induced Dysfunction and Fibrosis of Left Ventricle.

第 78 回日本循環器学会学術集会(2014 年 3 月 21 日, 東京)

【染色体立体構造からのヒト iPS 細胞未分化維持機構へのアプローチ】

○研究代表者: 神吉康晴 特任助教(東京大学先端科学技術研究センター)

再生医科学研究所共同研究者: 山下 潤 教授(幹細胞分化制御研究分野)

○研究経過及び研究成果:

申請者は, 細胞特異性を決定しているエピジェネティクス機構の中で, 染色体構造に着目し, 次世代シーケンサーを用いて染色体構造を解析する手法 ChIA-PET(Chromatin Interaction Analysis by Pair-End Tag Sequencing)を用いて, ヒト血管内皮細胞の解析には既に成功している. 今回の共同研究では, 血管内皮細胞と共通の precursor をもつ血球系細胞及びヒト iPS 細胞を用いて, 分化系における染色体配置のダイナミクスを解析することを目指した. これまでの染色体網羅解析の欠点は, 異なる染色体間の相互作用を拾えていないこと, ある一定以上距離の離れた相互作用は検出できていないこと, であった. そこで, 今回我々は, 既存の ChIA-PET データの新たな解析アルゴリズムを構築し(論文投稿予定), 2M base 以上離れた相互作用や, 異なる染色体間での相互作用の検出に成功した.

上記手法を用いてヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)とヒト白血病細胞株(K562)における ChIA-PET データを解析し, 特に相互作用が集積している領域を見出し, その遺伝子を hub gene を名付けた. 更に, RNA-seq の結果と合わせることで, hub gene と細胞特異的遺伝子発現には強い相関があることが分かった.

今後は, hub となっている領域に集積しているファクトリーを同定すること, 更に, 分化を制御するような染色体動的因子が存在するのか, 等を解析目標として研究を進める予定である.

○研究成果の公表

〈論文〉

1. Yasuharu Kanki, Taichi Matsunaga, Kohei Yamamizu, Hiroyuki Aburatani, Youichiro Wada, Tatsuhiko Kodama, Jun K Yamashita, Takashi Minami「Genetic and Epigenetic Landscape of Endothelial Cells Differentiation reveal the Transcriptional Factors Network」(投稿予定)

〈学会発表〉

1. The 12th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting(2014 年, バンクーバー)にて発表(予定)

【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：

マウス精子形成の幹細胞として機能する GFR α 1 陽性細胞の精巣内の挙動を、ライブイメージング法とパルスラベル法を用いて、初めて単一細胞レベルで詳細に解析した。その結果明らかになった幹細胞の動態は、40 年以上信じられて来た定説で説明出来ないものであった。数理モデリングを用いて、今まで幹細胞と信じられて来た細胞とともに、分化に向かっているとされて来た細胞に本質的な差がなく、全体として一つの幹細胞プールを形づくっているという新しいモデルを提案した。更に、この幹細胞プールのサイズ(幹細胞の数)の決定に関わる細胞外因子の候補を見出し、それを産生する細胞の知見とあわせて、精巣内の幹細胞システムについての新規の知見を明らかにした。

○研究成果の公表

K. Hara, T. Nakagawa, H. Enomoto, M. Suzuki, M. Yamamoto, *B. D. Simons and *S. Yoshida: Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. Cell Stem Cell 14(5): 658-672(2014)

doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.019>

T. Shirakawa, R. Yaman-Deveci, S. Tomizawa, Y. Kamizato, K. Nakajima, H. Sone, Y. Sato, J. Sharif, A. Yamashita, Y. Takada-Horiwara, S. Yoshida, K. Ura, M. Muto, H. Koseki, T. Suda and *K. Ohbo: An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to exit the undifferentiated state toward a Kit-positive identity Development 140, 3565-3576(2013) September 1

doi: 10.1242/dev.094045

・講演

〈招待講演〉

吉田松生: Sperm stem cell behavior in mouse testis. Workshop “Animal diversity and Developmental Biology II” International Mini-Symposium, “Eco-Devo-Evo”京都大学理学研究科 2014 年 3 月 22 日

吉田松生: 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「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成 25 年度共同研究報告会京都大学再生医科学研究所 2014 年 3 月 12 日

吉田松生: マウス精子形成を支える幹細胞の正体とその動態 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 25 年度学術講演会 京都 2013 年 12 月 25 日

S. Yoshida: In vivo behavior of mouse spermatogenic stem cells in testicular microenvironment. Institute of Biological Sciences at Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, Nov. 29, 2013

S. Yoshida: Useful tools to investigate spermatogonial stem cells. Institute of Biological Sciences at Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, Nov. 29, 2013

S. Yoshida: Towards the understanding of the sperm stem cell niche in the mouse testis. IV Workshop on Male Reproductive Biology, São Paulo, Brazil, Nov. 27, 2013

S. Yoshida: Dynamics of the mouse spermatogenic stem cells in seminiferous tubules. IV Workshop on Male Reproductive Biology, São Paulo, Brazil, Nov. 26, 2013

S. Yoshida: Spermatogenic stem cell dynamics in the mouse testis. EMBL Monterotondo, Italy, Oct 25, 2013

S. Yoshida: Toward the fuller understanding of identity and behavior of the mouse spermatogenic stem cells. Sapienza University of Rome, Italy, Oct 23, 2013

吉田松生: Stem Cell Dynamics in Mouse Spermatogenesis: a combination of live-imaging, pulse-labeling, and in silico modeling studies 発生・細胞生物学・システム生物学ジョイントコース 多次元定量イメージングに基づく数理モデルを用いた動的生命システムの革新的研究体系の開発・教育拠点 京都 2013 年 6 月 28 日

吉田松生: 京都大学ウイルス研究所ウイルス研究の潮流シリーズ講義 マウス精子形成幹細胞の正体とふるまい 京都 2013 年 6 月 26 日(共同利用・共同研究拠点セミナー 再生医科学研究所セミナー)

S. Yoshida: Niche microenvironment for the mouse spermatogenic stem cells. The XXII North American Testis workshop “The Foundations of Male Fertility”, San Antonio, Texas, April 10-13, 2013

〈研究集会〉

北館 祐, 丸山亜裕美, 市川理恵, 吉田松生: 精子幹細胞を制御する微小環境ニッチの解明 日本発生生物学会秋季シンポジウム 2013 神戸 2013 年 11 月 18 日-20 日

北館 祐, 丸山亜裕美, 市川理恵, 吉田松生: ニッチ微小環境による精子幹細胞の解析 生殖エピゲノム若手勉強会 2013 大阪 2013 年 11 月 14 日-15 日

K. Hara and S. Yoshida: Maintenance of spermatogenic stem cells follows from dynamic heterogeneity in mouse testis. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Stem Cell Biology, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 24 -28, 2013

Y. Kitadate, S. Yoshida: Peritubular cells expressing CXCL12/FGF5 sustain spermatogonial stem cells in mice. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Stem Cell Biology, Cold Spring Harbor, New York, USA, October 24-28, 2013

伊神香葉子, 杉本 亮, 吉田松生: レチノイン酸応答性の不均一を幹細胞集団がマウス精子形成を持続させる 日本動物学会第 84 回大会 岡山 2013 年 9 月 26-28 日

徳江 萌, 吉田松生: マウスの精子形成 “潜在的幹細胞” の制御機構 日本動物学会第 84 回大会 岡山 2013 年 9 月 26-28 日

原健士朗, 吉田松生: マウス精子幹細胞の多様な細胞運命 第 106 回日本繁殖生物学会大会 東京 2013 年 9 月 12 日-14 日

北館 祐, 丸山亜裕美, 市川理恵, 吉田松生: 精子幹細胞ニッチと血管のワイヤリング新学術領域研究「血管-神経ワイヤリングにおける相互依存性の成立機構」大阪 2013 年 8 月 26 日-28 日

Y. Kitadate and S. Yoshida: Characterization of mammalian spermatogenic stem cell niche. The 46th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists(JSDB)cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN), Kunibiki Messe, Matsue, Shimane, Japan, May 28-31, 2013

2014 年度共同研究課題一覧

研 究 代 表 者	再生医科学研究所共同研究者	研 究 課 題 名
放射線医学総合研究所放射線防護研究センター 柿沼志津子 チームリーダー	細胞機能調節学分野 藤本 真慈 助教	新生児マウス胸腺細胞の放射線照射後の再生増殖に関わる分化細胞の同定と TCR β 鎖遺伝子再構成の解析
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 宿南 知佐 教授	生体分子設計学分野 開 祐司 教授	コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の腱・靱帯形成過程における役割
大分大学医学部 佐々木 隆子 助教	生体分子設計学分野 開 祐司 教授	細胞外基質分子 fibulin-4 の腱・靱帯機能維持における役割解明
放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター 青木伊知男 チームリーダー	生体材料学分野 田畑 泰彦 教授	再生治癒過程における幹細胞動態の非侵襲的追跡を実現する細胞標識ナノプローブの高度化
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 狩野 光伸 教授	生体材料学分野 山本 雅哉 准教授	バイオマテリアルを用いた構造制御された血管ネットワークの生体外構築
京都府立医科大学附属病院 濱口 真英 研究員	組織修復材料学分野 岩田 博夫 教授	免疫抑制剤不使用下でのインスリン分泌細胞の同種移植とその生着機構の解析
国立遺伝学研究所 川上 浩一 教授	再生増殖制御学分野 瀬原 淳子 教授	ゼブラフィッシュを用いた、脳構築・維持に関わる支持細胞・支持機構の解明
京都大学大学院医学研究科 祝迫 恵子 特定講師	再生免疫学分野 河本 宏 教授	iPS 細胞から誘導した肝細胞に対する免疫反応についての解析—ドナー不要の肝不全治療を目指して—
佐賀大学大学院工学研究科 中山 功一 教授	組織再生応用分野 戸口田淳也 教授	大型細胞構造体作製を目指した、構造体内部細胞動態の解析
国立がん研究センター研究所 大木理恵子 研究員	器官形成応用分野 角 昭一郎 准教授	膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 X の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立
京都大学大学院医学研究科 西尾 健資 助教	臓器再建応用分野 中村 達雄 准教授	脊髄切断後の早期軸索再生機構の電子顕微鏡的解析
鳥取大学大学院医学系研究科 白吉 安昭 准教授	胚性幹細胞研究分野 末盛 博文 准教授	ヒト ES 細胞に由来する特殊心筋と固有心筋の選別採取法の開発とその特性解析
東北大学大学院薬学研究科 土井 隆行 教授	幹細胞分化制御研究分野 山下 潤 教授	心臓再生治療に向けた新規低分子化合物の合成研究
京都府立医科大学医学研究科 八木田和弘 教授	附属再生実験動物施設 近藤 玄 教授	CRISPR/Cas9 法とイメージング技術を駆使したマウス体内時計の発生メカニズム解明
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上岡 寛 准教授	バイオメカニクス研究領域 安達 泰治 教授	生骨組織中の骨細胞の 3 次元ライブイメージング手法の構築とメカノセンサーとしての細胞形態形成の意義を探索

6. 協議員・教職員・その他構成員名簿

(平成 27 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 (JT 生命誌研究館顧問)
 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, 安 達 泰 治

■ 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 講師(非常勤)：西川周一
 大学院生：小幡晃一, 宮崎恵理, 馬淵智仁, 室 貴大 研究生：于 尚誉
 講師：平芳一法 研究員：法邑賢一
 助教：藤本真慈 講師(非常勤)：清水健之

〈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 研究員：大崎一直
 教務補佐員：松浦真由美, 山本恵津子, 木本富子

〈生体システム制御学分野〉

教授：長澤丘司 助教：杉山立樹, 尾松芳樹 研究員：中川俊徳 技術補佐員：西本千晃 事務補佐員：山田祐子
 大学院生：青木一成, 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 客員教授：宿南知佐 講師(非常勤)：近藤 淳、鄭 雄一、小守壽文、池川志郎 助教：三浦重徳
特定助教(研究拠点)(学際融合教育研究推進センター)：滝本 晶
技術補佐員：杉山弘美 大学院生：郭 龍 PD：山下 寛

〈生体材料学分野〉

教授：田畑泰彦 准教授：山本雅哉 助教：城 潤一郎 講師(非常勤)：小川佳宏、中村雅也、金田安史、青木伊知男
特定研究員：松井 誠 研究員：堀江理恵 事務補佐員：吉岡奈美、高橋香織
大学院生：齊藤高志、戸田裕之、田村 亮、田島脩平、金 亮希、高田 聡、山下幸大
有本晃佑、西本慶喜、永田純平、村尾 賢、千野裕太郎、三浦篤史、吉本 雄 学部生：明石祐典、西本高明、平井亮輔
研究生：横田憲昌 受託研究員：小暮喜代志、須田 清、藤井健司、駒田行哉、高橋素子
民間等共同研究員：前野恵美、井出正迪、水嶋明宏
その他：金丸麻衣、堀場正寛、山崎未奈

〈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)：滝 和郎 特定研究員：児玉智信、小長谷周平
研究員：Ian Torao Hoffecker、中井隆介 事務補佐員：鈴木義子
大学院生：Edgar Yuji Egawa、榎原 令、小松光栄、松井利樹、西澤佑馬、平居佑亮、松岡洋佑
学部生：月見亮介、西川尚哉、西山喬晴
民間等共同研究員：山内敏明、野田雄一郎、中西直之、松村 拓、平野邦生、松浦佑樹、野田祐輝、青木一良

〈生体物性学分野(国内客員)〉

客員教授：吉田松生

■ 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、特定助教(研究拠点)(学際融合教育研究推進センター)：佐藤文規
講師(非常勤)：武田洋幸、富田泰輔 教務補佐員：平向洋介、西郷大吾 技術補佐員：黒田信子 事務補佐員：渡邊祐子
大学院生：堀 新平、栗木麻央、曾我部舞奈、津曲和哉、徳増雄大、王 梓、チェミンヨン、庄司栄美、亀崎青沙、荒井宏行

〈再生免疫学分野〉

教授：河本 宏 助教：増田喬子、宮崎正輝 講師(非常勤)：渡部良広 特定研究員：島津 裕、宮崎和子
事務補佐員：小野田由美、藤井絵理香、池田久美 技術補佐員：作本和義、仙波都志香、佐藤恵理
大学院生：前田卓也、河田岳人、櫻田麻希、永野誠治、岩本芳浩、一瀬大志、Nicole Koller

■ 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：◇土井大輔、◇西村周泰、◇菊地哲広、◇元野 誠
研究員：◇山崎絵海 技術補佐員：◇小ノ嶋優子、◇芦田知佳、◇森田由紀子、◇谷川良恵、◇片野友貴、◇藤田雄大、◇宗圓美香
事務補佐員：◇中村仁美 教務補佐員：◇窪田 慶 学部生：◇中島悠介
大学院生：◇佐俣文平、◇五百蔵義彦、◇小芝 泰、◇佐野徳隆、◇宮脇良文、◇Grinand Luc、◇春原 匡、◇小倉健紀

〈組織再生応用分野〉

教授：戸口田淳也 准教授：◇池谷 真 特定研究員：◇加藤友久 研究員：金 永輝，玉置さくら
 事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵 大学院生：日根野翔，関口和也，松永一仁(特別研究学生)，川井俊介，◇中島大輝
 研究生：福田 誠 民間等共同研究員：◇堀込一彦，◇日野恭介，◇渡辺 真，◇山本理絵，◇Cantas Alev
 その他：◇西尾 恵，◇辰井勇介

〈器官形成応用分野〉

准教授：角 昭一郎 研究員：金宗 潤 講師(非常勤)：砂村真琴，日裏彰人，小川知彦，白水泰昌
 大学院生：楊 凱強 研究生：柳井伍一 民間等共同研究員：近田英一，川越雅子 事務補佐員：上野小寿恵

〈臓器再建応用分野〉

准教授：中村達雄 講師(非常勤)：稲田有史，堀 義生，茂野啓示，萩原明於，村田宮彦 教務補佐員：矢延聡枝
 技術補佐員：石田久恵 大学院生：若槻麻里子，濱路政嗣，小松輝也，坂口泰人，豊 洋次郎，辻本源太郎(特別研究学生)
 研究生：金子真弓，畑山敬秀 研修員：井上祐利，中本裕也，小島史嗣，野口敏彦

〈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：細川美穂子
 教務補佐員：森部江美子，酒井睦美 大学院生：刀谷在美，望月綾子，林 瑛理，中川史之
 *磯部武久，*西岡尚恵

〈胚性幹細胞研究分野〉

准教授：末盛博文 講師：川瀬栄八郎(特定講師) 客員教授：高橋恒夫 客員准教授：楠田美保
 教授：浅田 孝(特任教授)
 特定研究員：宮崎隆道，山内香織，高田 圭 技術補佐員：濱生麻里
 事務補佐員：廣富ひとみ 教務補佐員：采女久美子

〈幹細胞分化制御研究分野〉

教授：◇山下 潤 助教：◇山永康平 特定研究員：◇福島弘之，◇吉岡美樹 研究員：◇武田匡史
 研究支援推進員：◇高久保瞳 事務補佐員：◇井上 綾 教務補佐員：◇村山千里，◇志野瑞穂
 大学院生：◇幾野 毅，◇皆川朋皓，◇リュウヤーチン，◇柳瀬 諒，◇松家未来，◇楊 振楠，◇立石知佳，◇川東正英，
 ◇瀧本真也 研修員：星野託広

〈幹細胞加工研究分野〉

准教授：多田 高 研究員：福地恵美 大学院生：藤枝雅博，曹 準権，勅使河原利香

■ 附属再生実験動物施設 ■

教授：近藤 玄 技術職員：出口央士(技術専門職員)，渡邊仁美，荻原智幸
 技能補佐員：石丸英典，竹明フサ，川北美奈子，竹内 宏，向 一哲，大場雅之，吉田美保，高溝一郎
 研究支援推進員：西山尚之，古卿智英，永井智美，佐々木 勉，上坂宗万
 事務補佐員：北澤志津江 労務補佐員：片山龍一

■ 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 助教：笠井倫志 研究員：※根本悠宇里，※角山貴昭，※白居祐希，※幸重美津子

教務補佐員：※坪井久恵，※小島久美子，※入谷真由子

大学院生：幕田将宏，宮原愛美，吉田謙太，陳 莉敏，石川慶郎，近藤愛子，足立紘昭，後藤純理

学部生：栗根 遼，大原駿平，内藤一馬 学振外国人特別研究員：周 鵬 学振特別研究員：※平本菜央

〈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 講師(非常勤)：東 高志

〈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，森下喜弘，須藤 亮，山形 豊

助教：平島 剛志(特定助教) 事務補佐員：坂田寿子 教務補佐員：須長純子

大学院生：藤井徹矢，牧 功一郎，方 正直，鈴木健介，大戸康平，田中孝明，玉木嵩人，渡辺惟史，今井 桂，

榎本祥英，広橋佑紀，藤井宣成 学部生：大道泰樹，折井将彦，鎌田啓輔，谷口真司，中山雅宗，新田泰大

民間等共同研究員：鈴木雅登 私学研修員：本田義知 特別研究学生：長坂 新

〈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

■ 事務部 ■

事務長：古田靖高

総務掛長：村田 諭 主任：原 彰子 事務補佐員：戸倉理恵子

※：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 2014

京都大学再生医科学研究所年報 2014

2015 年 7 月 1 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
