システム免疫学統合研究センター

Research Center for Systems Immunology

情報生物学分野
Division of Bioinformatics

教　授：須山　幹太
Professor：Mikita Suyama, Ph.D.

情報生物学分野では，計算機を用いたバイオインフォマティクス解析，特に，ゲノム配列やエピゲノムについてのデータの比較解析から，遺伝子の発現制御機構やその異常による疾患発症機序を解明することを目的にして研究を進めている．具体的には，がんゲノムコンソーシアムやエピゲノムコンソーシアムの進展により蓄積している生命医科学ビッグデータを積極的に活用し，がんの予後関連因子の探索や疾患関連遺伝子発現制御機構の解析を行っている．また，マイクロアレイや次世代シーケンサーといったハイスループットな技術革新に伴い，生命医科学全般においてバイオインフォマティクス解析，すなわち計算機を用いた大規模なデータ解析が必須となってきている．このような現状においては，実験生物学者と情報生物学者の連携が重要であり，そのため当研究室では積極的に共同研究を行うとともに，データ解析技術の普及にも務めている．

平成 31 年度（令和元年度）は，須山幹太（教授），菊竹智恵（助教），吉原美奈子（特任助教），吉村香（テクニカルスタッフ）に加え，大学院生 6 名の体制で研究を進めた．

Ａ．非コード領域におけるドライバー変異の探索

がんは細胞の成長や増殖，細胞周期の調節不全を伴う細胞集団のことである．様々な要因により遺伝子上に変異が生じ，そして蓄積していくことでやがてがんが発症する．がんの進化過程では数多くの遺伝子変異が生じるが，その中でも特にがんの発生や進行に関与する遺伝子変異はがん治療における薬剤ターゲットとなりうるため，これまで数多くのがん関連遺伝子変異が同定されてきた．しかしながら，このような変異情報によってがんについての十分な情報が得られたとは言えない．なぜなら，これまでに同定された変異は主としてゲノム全長の約 2%を占めるコード領域における変異であり，残りの 98%を占める非コード領域における変異もまたがんの要因となり得るからである．

そこで本研究では，非コード領域におけるがん関連変異を探索するため，変異のホットスポットに着目した．独立な複数のサンプルにおいてランダムに変異が生じると考えた場合，同一箇所に変異が生じる可能性は極めて低い．したがって，ホットスポットを含む領域は，遺伝子の発現制御をはじめとする何らかの機能を持っていると考えられる．COSMIC 由来の非コード領域の変異データを用いて解析した結果，149 個の非コードドライバー変異候補が見つかった．その中の変異の 1 つは，*NFATC4* プロモーターと相互作用し得る領域に位置していた．発現および生存分析により，この領域が *NFATC4* の発現量を調節しており，がんの進行と関連している可能性があることが示唆された．

B．乾癬の発症リスクに関与する機能多型の網羅的探索

ヒト疾患の多くは一塩基多型（single nucleotide polymorphisms; SNPs）などの複数の遺伝的要因の積み重ねによって引き起こされる多因子疾患である．これまで，SNPsと疾患を含む様々な形質との関連を調べる手法であるゲノムワイド関連解析（genome-wise association study; GWAS）が様々な形質に対して実施されており，多くの疾患リスクSNPsが同定されているが,報告されているSNPsはマーカーに過ぎず,実際に影響を及ぼしている機能多型の多くは未だ不明なままである．分子病態の詳細を理解するためには，機能多型を同定した上でそれぞれが遺伝子機能にどのような影響を及ぼしているのか，その作用機序を明らかにする必要がある．本研究では，代表的な多因子疾患である慢性皮膚角化疾患の乾癬を対象として，公共エピゲノム・トランスクリプトームデータの統合・再解析による機能多型の網羅的探索を行った．

これまで本解析により22個の乾癬関連機能多型を同定した．それらのうち，非コード領域に位置するものは8個であり，全てが未報告であった．とくに，1番染色体に存在する多型（rs72635708）がEGF signaling制御因子をコードする*ERRFI1*遺伝子の遠位エンハンサー領域に存在することを発見した．このエンハンサー領域にはAP-1転写因子を構成するタンパク質の結合が認められ，rs72635708はその認識配列に位置していたことから，この多型はAP-1転写因子の結合レベルを変化させ転写活性を減少させる可能性が考えられた．また，DNase-seqデータのallele-specific mappingの結果を参照すると，この多型はクロマチン構造を変化させることも明らかになった．以上の結果より，乾癬発症に関与する機能多型およびターゲット遺伝子の具体例を初めて示すことができた（原著論文3）．

今年度は，コード領域の中でも，アミノ酸配列を変化させないが，近傍遺伝子の発現レベルに影響を与える新しいタイプの有害な多型の発見に成功した．エンハンサーなどの近傍遺伝子の発現を制御する領域は，その多くが非コード領域に位置しているが，いくつかのエンハンサーはエクソン領域にも存在していることを明らかにし，そのようなエクソンを“regExon”と定義した．さらに，遺伝性疾患のリスクとして報告されている多型がregExonに存在し，アミノ酸配列を変化させないものの，近傍遺伝子の発現レベルを変化させることを見出した．以上の結果より，当初の目標である非コード領域だけではなく，アミノ酸配列をコードするエクソン領域においてもこれまで見過ごされてきた有害な多型を同定することができた．

C．エクソンSNVデータに基づく近交系ラット25系統の系統関係の解析

次世代シーケンサーから得られるゲノムデータに基づいて系統樹を推測する場合，特に配列が非常に近い亜系統間のゲノム配列アライメントにおいて，ゲノム間の系統関係を反映しない不一致性を示す突然変異部位の存在(discordant site)がしばしば観

察される．Discordant site とは共通祖先から由来した種間において，種の分岐過程を表した系統樹である species tree と遺伝子についての系統樹である gene tree が一致しない現象である．すなわち，亜系統に存在する多型が他の系統でも見られる部位を示す．Discordant site は祖先多型（ancestral polymorphism）または遺伝子流動(gene flow)により出現したと考えられ，ゲノムにおけるそれらの頻度および分布の詳細は解析されてこなかった．

ラットは古くからヒト疾患モデル動物として広く利用されており，詳細な系統解析は亜系統間の免疫反応実験などにおいて非常に重要である．そこで，本研究では，近交系ラット 25 系統の全ての遺伝子コード領域のデータを用いて discordant site の探索を行った．その結果，discordant site はラットの亜系統クラスターによらず，類似した分布を示しながらゲノム全体に広く認められた．特に，そのゲノム上の分布から，discordant site を含む遺伝子は免疫系及び嗅覚受容体遺伝子に多いことを見出した．また，その変異の出現パターンから，近交系ラットの共通祖先にすでに存在していた祖先多型が子孫にランダムに伝わったものと推測された（原著論文 4）．

D．In silico 解析による個人ゲノムデータ及びトランスクリプトームデータを用いた pseudo-exon activation の網羅的探索

遺伝性疾患の主な原因として，アミノ酸をコードしているエクソン領域に変異が入ることが知られている．しかし，最近，エクソン領域の変異だけでなく，アミノ酸をコードしていないイントロン領域で，スプライス部位に全く関係のない，より深い領域に変異が入ることが疾患の原因となっていることが相次いで報告されている．これは，変異により新たなスプライス部位が形成され，本来イントロンの一部であった領域がエクソンとして転写産物に取り込まれることで異常な mRNA を形成することによるものである．このような現象は pseudo-exon activation と呼ばれている．そこで，この現象がどの程度の割合で見られるものであるかを明らかにすることを目的とした解析を行った．方法として，個人ゲノムデータ及びトランスクリプトームデータを用いて，このようなイントロン変異による pseudo-exon activation を網羅的に探索することが可能な解析パイプラインを構築した．このパイプラインでは，個人の SNP 情報を反映させたリファレンスゲノムを構築することで，その個人のトランスクリプトームデータを精度よくマッピングするようにした．このパイプラインを 1000 人ゲノムプロジェクトより得られたデータのうち，末梢血由来の質の高いトランスクリプトームデータが得られている 235 人分のデータに適用した．その結果，今まで疾患の原因として散発的に報告されていた pseudo-exon activation という現象が，疾患の有無に拘わらず普遍的に見られるものであることを明らかにした．個人あたり平均で約 3 ヶ所の pseudo-exon activation が存在した．また同様の解析を大脳皮質と肝臓のサンプルを使用し解析を行ったところ，同様にそれぞれの組織で個人あたり平均約 3 ヶ所の

pseudo-exon activationが存在した．これらの結果は，疾患原因変異の探索においてイントロンの深い位置でpseudo-exon activationが起きている可能性を考慮することの重要性を示すものである．

業績目録

原著論文

1. Ishiuchi T, Ohishi H, Sato T, Kamimura S, Yorino M, Abe S, Suzuki A, Wakayama T, Suyama M, Sasaki H. (2019, May).
   Zfp281 Shapes the Transcriptome of Trophoblast Stem Cells and Is Essential for Placental Development.
   Cell Rep. 27, 1742-1754.
2. Miki M, Oono T, Fujimori N, Takaoka T, Kawabe K, Miyasaka Y, Ohtsuka T, Saito D, Nakamura M, Ohkawa Y, Oda Y, Suyama M, Ito T, Ogawa Y. (2019, Jul).
   CLEC3A, MMP7, and LCN2 as novel markers for predicting recurrence in resected G1 and G2 pancreatic neuroendocrine tumors.
   Cancer Med. 8, 3748-3760.
3. Kubota N, Suyama M. (2020, Jan).
   An integrated analysis of public genomic data unveils a possible functional mechanism of psoriasis risk via a long-range *ERRFI1* enhancer.
   BMC Med. Genomics 13, 8.
4. Kim H, Yoshihara M, Suyama M. (2020).
   Comparative genomic analysis of inbred rat strains reveals the existence of ancestral polymorphisms.
   Mamm. Genome, in press.

学会発表

1. Chie Kikutake, Mikita Suyama. (2019, 7/17-18).
   Pan-cancer analysis of intratumor heterogeneity associated with patient prognosis.
   The 22nd Retreat 2019, Kumamoto.
2. Hyeon-jeong Kim, Minako Yoshihara, Mikita Suyama. (2019, 7/17-18).
   Phylogenetic analysis of 25 inbred rat strains.
   第3回木村資生記念 進化学セミナー，静岡．
3. 菊竹智恵，須山幹太．(2019, 7/27).
   腫瘍内不均一性を基にしたがんの予後解析．

第 3 回学際的がん研究夏の学校@別府，大分.

4. 菊竹智恵，須山幹太．(2019, 9/9-11).
Pan-cancer analysis for mutations hotspots in non-coding elements.
第 8 回生命医薬情報学連合大会，東京.

5. Chie Kikutake, Mikita Suyama. (2019, 9/26-28).
がんの進化過程を利用した新規バイオマーカーの同定.
第 78 回日本がん学会学術総会，京都.

6. 久保田直人，須山幹太．(2019, 10/2).
公共データの統合・再解析による乾癬関連機能多型の網羅的探索.
第 14 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム，大阪.

7. 菊竹智恵，須山幹太．(2019, 12/3-6).
がんゲノムデータを用いた非コード領域における変異ホットスポットの網羅的解析.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

8. 久保田直人，須山幹太．(2019, 12/3-6).
公共データの統合・再解析による乾癬関連機能多型の網羅的探索.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

9. 高橋史也，馬場崇，Christianto Antonius，戌亥海，須山幹太，大川恭行，諸橋憲一郎．(2019, 12/3-6).
マウス副腎皮質束状層細胞における転写産物量の性差.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

10. Mikita Suyama, Minako Yoshihara, Chie Kikutake. (2019, 12/8-10).
Pan-cancer analysis of recurrent mutations in noncoding elements.
Chromosome Dynamics "A symposium on chromatin domains and genome stability in honor of the 150th anniversary of the discovery of DNA", Basel, Switzerland.

11. Narumi Sakaguchi, Mikita Suyama. (2019, 12/09).
In silico analysis of pseudo-exon activation events in personal genome and transcriptome data.
Joint 30th International Conference on Genome Informatics (GIW) & Australian Bioinformatics and Computational Biology Society (ABACBS) Annual Conference, Sydney, Australia.

12. Chie Kikutake, Mikita Suyama. (2020, 2/6-7).
Pan-cancer analysis for mutation hotspots in non-coding elements.
The 29th Hot Spring Harbor International Symposium “Cutting Edge of Technical Innovations in Trans-Omics”, Fukuoka, Japan.

粘膜防御学分野
Division of Mucosal Immunology

教　授：澤　新一郎
Professor：Shinichiro Sawa, M.D., Ph.D.

粘膜組織は生体防御の最前線であり，感染症やアレルギーなど免疫が関与する種々の疾患の主座になりうる．当分野では，粘膜組織に局在する３型自然リンパ球(ILC3)や機能的間葉系細胞に注目し，宿主免疫系と共生微生物との双方向性活性化機構や平衡維持を担う原理原則の解明，免疫組織形成機構の解明を目指している．現在はマウス遺伝学と網羅的遺伝子発現解析を技術的な両輪とし，粘膜関連リンパ組織における細胞―細胞間ネットワークや腸管細胞―微生物間ネットワークの解明を進めている．これらの基礎的な研究が炎症性腸疾患や食物アレルギーなど，ヒトの粘膜組織を主座とする様々な疾患の病態解明へとつながると想定している．

令和元年度は科研費の挑戦的研究（萌芽），基盤研究 B，若手研究 B，日本医療研究開発機構 AMED 委託事業などの補助金による支援をうけ，ILC3 の生体内機能解明，リンパ組織形成機構の解明，胎生期における骨髄形成機構の解明を行った．また，アステラス製薬との共同研究を行い，ILC3 の生体内動態を検討した．

令和２年３月１日より准教授１名（香城諭），テクニカルスタッフ２名（重藤麻美，田中桂子）が参加した．

Ａ．３型自然リンパ球による腸管粘膜制御機構の解明

ａ．３型自然リンパ球特異的欠損マウスモデルの作出

自然リンパ球(Innate Lymphoid Cell=ILC)は T 細胞や B 細胞，NK 細胞とも起源を異にし，抗原受容体を有さないリンパ球群の総称である．このうち３型自然リンパ球(ILC3)は我々が 2008 年に発見し，腸管リンパ組織形成や腸管粘膜バリア機能の維持に極めて重要な役割を果たすことを報告した（Satoh-Takayama et al.，Immunity，2008；Sawa et al，Science，2010）．ILC3 のうち，ckit^{high} CCR6 陽性分画はパイエル板や Cryptopatch などのリンパ組織に局在し，LTi-like 細胞と呼ばれている．しかし，腸管における LTi-like 細胞の役割は完全には明らかになっていない．我々は ILC3 特異的にジフテリア毒素受容体(DTR)を発現するマウスモデル(ILC3-iDTR マウス)の作出に成功し，ジフテリア毒素投与後の腸管 ILC3 分画の数的変化を詳細に解析した．その結果，ジフテリア毒素 1 回投与による LTi-like 細胞除去作用は極めて高く，数ヶ月単位で減少状態が維持されていた．今年度，LTi-like 細胞が特異的に欠失するマウスとして ILC3-iDTR マウスを国立大学法人北海道大学より特許出願した(特願 2017-016832，PCT/JP2019/003185）．

ｂ．腸管における３型自然リンパ球機能の解明

ジフテリア毒素を腹腔内に１回投与したILC3-iDTRマウスではLTi-like細胞のみならずパイエル板や腸間膜リンパ節におけるＴ細胞やＢ細胞数も激減した．パイエル板のリンパ濾胞の構造が崩壊していた．また，新生仔期よりLTi-like細胞を継続的に除去し続けたマウスでは離乳後に腸炎が自然発症した．これらの結果は，LTi-like細胞は成体リンパ組織の維持に極めて重要な役割を果たしていること，LTi-like細胞が腸管バリア機能の維持に中心的役割を担う ILC3 であることを強く示唆する内容である（現在論文投稿準備中）．

Ｂ．RANKL陽性間葉系細胞による免疫組織形成機構の解明

免疫系に重篤な欠損がある個体は新生児期の生体防御機構が働かず，生き延びることができない．特に粘膜組織は出生時に微生物が侵入する経路となるため，腸管上皮や粘膜関連リンパ組織(Gut-Associated Lymphoid Tissue=GALT）は個体の生死を分ける重要な免疫防御網として機能する．そこで，本分野では腸管免疫を担うパイエル板や腸管膜リンパ節，全血球系細胞の起源である骨髄が形成されるメカニズムを間葉系細胞に注目して解明する．

ａ．リンパ節形成機構の解明;リンパ節オーガナイザー細胞の同定

TNF ファミリーサイトカインの一種である RANKL はリンパ節形成に必須の分子であることが1990年代後半から知られていたが，リンパ節形成におけるRANKLの役割や産生細胞については不明な点が多かった．これまで我々はリンパ管内皮への RANKL 刺激がリンパ節形成に必須であることを証明している（Onder et al., Immunity, 2017）．今年度は，RANKL レポーターマウスや細胞系列特異的な RANKL 欠損マウスを用いた実験から，胎児期に RANKL を発現する間葉系細胞がリンパ節形成に必須の細胞であることを明らかにした．これまで，LTi 細胞と呼ばれるリンパ球とオーガナイザー細胞と呼ばれる間葉系細胞の双方向性活性化がリンパ節形成に重要であると提唱されてきたが，オーガナイザー細胞の実態は明らかでなく，リンパ節形成現象を時空間的に紐解くことは不可能であった．本研究結果は RANKL 陽性間葉系細胞こそが真のオーガナイザー細胞であることを世界に先駆けて提唱する貴重な内容である（現在論文投稿準備中）．

ｂ．パイエル板成熟機構の解明；MCi 細胞の時期特異的標識・追跡系の確立

パイエル板などの粘膜関連リンパ組織には上皮細胞の一種であるMicrofold細胞（M細胞）が存在し，管腔側から抗原を直接取り込む．我々はこれまでＭ細胞分化に必須

の間葉系細胞（M cell inducer=MCi 細胞)の同定に成功し，MCi 細胞に発現する膜型サイトカイン RANKL の重要性を明らかにしてきた（Nagashima et al., Nat Immunology, 2017）．M 細胞を欠損するパイエル板では B 細胞濾胞が低形成であり，腸内細菌特異的 IgA 産生が低下し，腸内細菌叢の構成が変容する．一方，M 細胞は無菌マウスにも存在するため，MCi 細胞の出現は腸内細菌非依存的で遺伝的にプログラムされた現象と考えられた（Nagashima et al., Biochem Biophys Res Commun., 2017）．しかし，MCi 細胞が個体発生のどの時期に出現し，M 細胞分化誘導を開始するか明らかでなかった．本年度は時期特異的な RANKL 発現細胞の標識・追跡が可能な RANKL-tTA;LC1;tdTomato マウスの作出に成功し，MCi 細胞が出生直後から 1 週間以内に出現することを明らかにした．新生児早期における MCi 細胞出現は腸内細菌の選択的定着や免疫系の成熟過程におけるターニングポイントと考えられるため，今後は MCi 細胞の起源や再生プロセスを解明してゆきたい．また，生体防御医学研究所・免疫遺伝学分野との共同研究を行い，M 細胞分化には MCi 細胞由来 RANKL に加え，血球系細胞から産生される S100A4 が必須であることを明らかにした（Kunimura et al.,Cell Rep., 2019）．

ｃ．骨髄腔形成機構の解明；Fetal Osteoclast inducer 細胞の同定

野生型マウスの骨髄は出生時に形成され，造血を開始している．一方，RANKL を先天的に欠損するマウスは骨髄腔が狭小化し，骨髄外の組織で造血が行われる．新生児期以降の微生物生着に備え，粘膜バリア機能を維持するためには，骨髄造血を正常に行い，免疫細胞を粘膜組織に恒常的に供給する必要がある．マウスの大腿骨では胎生 15 日ごろから破骨細胞の作用による肥大軟骨の吸収と空洞形成が開始し，血管内皮と間葉系細胞から構成される骨髄が腔内に形成される．しかし，どのような分子メカニズムで胎児期の骨髄が形成されるか明らかになっていない．我々は胎生 15 日の RANKL レポーターマウスの大腿骨を組織学的に観察し，骨中央部に RANKL 陽性細胞が集積することを見出した．これらの RANKL 発現細胞を特異的に欠損させると破骨細胞分化誘導と骨髄腔形成が障害され，新生児期の骨髄が低形成になることが明らかになった．我々はこれらの RANKL 発現細胞を fetal Osteoclast inducer（fOci)細胞と命名し，マウス骨髄形成に不可欠な間葉系細胞として提唱した．遺伝子発現解析や細胞系譜解析の結果，fOCi は成体骨組織に存在する骨芽細胞，骨膜細胞，骨髄ストローマ細胞の共通前駆細胞に相当する細胞であることが明らかになった．

業績目録

原著論文

1. Kunimura K, Sakata D, Tun X, Uruno T, Ushijima M, Katakai T, Shiraishi A, Aihara R, Kamikaseda Y, Matsubara K, Kanegane H, Sawa S, Eberl G, Ohga S, Yoshikai Y, Fukui Y. (2019, Nov).
   S100A4 Protein Is Essential for the Development of Mature Microfold Cells in Peyer's Patches.
   Cell Rep. 29(9), 2823-2834.

総説

1. 渡部貴秀，澤新一郎. (2019, Nov).
   自然リンパ球とサイトカイン.
   週刊　医学のあゆみ　サイトカインのすべて 271 巻 5 号, 515-519.
2. 澤新一郎．(2020, Feb).
   細菌叢とは？
   周産期医学　特集号　周産期医学と細菌叢　50 巻 3 号, 285-287.

学会発表

1. 住谷瑛理子，澤新一郎．(2019, 6/7 - 6/8).
   骨と骨髄の発生における RANKL 陽性未分化間葉系細胞の寄与の解明.
   第 29 回 Kyoto T Cell Conference，京都．（一般演題・口頭発表）
2. 澤新一郎，住谷瑛理子．(2019, 6/7 - 6/8).
   Investigation for the cell lineage of lymph node stroma cells.
   第 29 回 Kyoto T Cell Conference，京都．（一般演題・口頭発表）
3. Shinichiro Sawa. (2019, 6/11).
   If ILC3s are absent, what happens in the gut?
   JSPS-Crick Symposium on Gut Circuits, London. (招待講演・口頭発表)
4. 澤新一郎．(2019, 8/16).
   リンパ節ストローマ細胞の起源に迫る.
   第 8 回生命科学阿波おどりシンポジウム，徳島．（招待講演・口頭発表）
5. Shinichiro Sawa. (2019, 10/3).
   RANKL+mesenchymal cell is the genuine lymphoid tissue organizer cell in the developing lymph node.
   第 14 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム，大阪．（一般講演・口頭発表）
6. 住谷瑛理子，澤新一郎．(2019, 10/12 - 10/14).
   胎仔破骨細胞誘導細胞の生体内における分化能の解析.

第 37 回日本骨代謝学会学術集会，神戸．（一般演題・ポスター発表）

7. Shinichiro Sawa. (2019, 12/11 - 12/13).
LTi-like cell conducts maturation of intestinal immune system.
第 48 回日本免疫学会学術集会，浜松．（シンポジウム・口頭発表）

8. 澤新一郎．(2020, 1/10).
「免疫の場」を構成する細胞群の運命追跡.
第 4 回理論免疫学ワークショップ，別府．（招待講演・口頭発表）

9. Eriko Sumiya, Shinichiro Sawa. (2020, 2/6 - 2/7).
Transcriptomic characterization of cells involved in fetal bone development.
The 29th Hot Spring Harbor International Symposium，福岡．（一般演題・口頭発表）

アレルギー防御学分野
Division of Allergy and Immunology

准　教　授：伊藤　美菜子
Associate Professor：Minako Ito, Ph.D.

当分野は，中枢神経系疾患における免疫応答制御に関する研究進めている．多発性硬化症や抗 NMDA 受容体抗体脳炎などの自己免疫疾患だけでなく，パーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患，さらには自閉症や統合失調症のような精神疾患においても免疫系の関与が示唆されている．脳内免疫においてはこれまではミクログリアを中心とした自然免役細胞が主な研究対象であったが，T 細胞や B 細胞などの獲得免役細胞も脳内に浸潤して脳内細胞を制御していることが明らかになりつつある．当研究分野では，脳梗塞マウスモデルを中心に，多発性硬化症・アルツハイマー病・統合失調症などの様々な中枢神経系疾患のマウスモデルを用いて病態の発症・収束・組織修復における免疫細胞の意義を解明することを目指している．具体的には，一細胞 RNA シークエンスや免疫染色などを用いて詳細に脳内免疫細胞の動態や意義を調べている．これらの解析を通じて脳内神経炎症にかかわる免疫系の共通原理を発見し，全く新しい治療法の開発につなげたいと考える．

当分野は令和 2 年 2 月 1 日に新設された分野で，令和 1 年度は伊藤美菜子（准教授）によって研究を進めた．

Ａ．中枢神経系疾患における制御性 T 細胞の意義の解析

脳梗塞急性期，亜急性期にはマクロファージを中心とした自然免疫細胞が脳内に浸潤して炎症の遷延化，神経症状の悪化を引き起こす．また，脳梗塞慢性期における獲得免疫系の意義についても解析を行い，脳梗塞発症後２週間以上を経過したマウスの脳内には急性期よりもはるかに多くの T 細胞が浸潤しており，特に制御性 T 細胞（Treg）が大量に蓄積することを明らかにした．また脳 Treg は Areg や IL-33 受容体を発現するなど組織 Treg の性質も有しているが，脳特異的な性質も示していることを以前に報告している（Nature 2019）．多発性硬化症モデル（EAE）やアルツハイマーモデルマウスにおいても同様の性質を示す Treg の存在を確認することができた．EAE モデルは脊髄と脳の両方に病態を形成するが，同個体でも脊髄と脳に存在する Treg のフェノタイプは異なっており，脳に存在する Treg は脳梗塞の脳内に浸潤した Treg の特徴に近かった．これらの結果より，組織 Treg は病態よりも局在する組織の環境によって性質を獲得している可能性が示唆された．また脳 Treg の TCR レパトア解析から，脳 Treg は脳梗塞による組織障害によって放出される何らかの抗原を認識して活性化すると考えられるが，脳由来の自己抗原は未だ不明である．現在，抗原や抗原に対する抗

体の同定のために，脳梗塞後における脳内免疫細胞一細胞レベルでの TCR・BCR レパトアと遺伝子発現解析を行っており，抗原によるワクチン療法や抗体療法を目指している．

B．脳梗塞後の泡沫化細胞の解析

泡沫化細胞はアテローム性動脈硬化症の特徴である脂肪蓄積したマクロファージである．マクロファージが酸化された LDL などの脂質を貪食することで生じる．脳組織は脂質の多い組織であるため，脳梗塞後によって死んだ脳細胞や残骸をマクロファージやミクログリアが貪食し，その結果として，脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現することを見出した．T 細胞と泡沫化細胞の関連を調べるために，T 細胞や Treg を欠損するマウスを用いて脳梗塞を作製したところ，T 細胞や Treg を欠損すると梗塞巣に泡沫化細胞や脂肪滴が残存しやすいことが分かった．脳に浸潤した Treg は，ABC（ATP-binding cassette）タンパクで，HDL コレステロールの産生に必須のトランスポーターである Abca1 や Abcg1 を高発現していることがわかった．また，脳 Treg は脂肪滴を細胞内に取り込んでいることが明らかになった．脳 Treg が直接的，もしくは間接的に脳に溜まった脂質の除去と泡沫化マクロファージの制御に関与することが示唆された．この現象は EAE マウスの Treg では認められず，脳梗塞後の脳 Treg 特異的であった．今後は，泡沫化細胞内に含まれる脂質の解析や，ミクログリアやマクロファージを特異的に除去することで泡沫化細胞の意義を解析することで，組織修復の促進を促すメカニズムの解明を目指す．

業績目録

原著論文

1. Nakatsukasa H, Oda M, Yin J, Chikuma S, Ito M, Koga-Iizuka M, Someya K, Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada YI, Yamanaka S, Takamura-Enya T, Lu Q, Yoshimura A. (2019, Apr).
   Loss of TET Proteins in Regulatory T Cells Promotes Abnormal Proliferation, Foxp3 Destabilization and IL-17 Expression.
   Int Immunol. 26;31(5), 335-347.

総説

1. Ito M, Komai K, Nakamura T, Srirat T, Yoshimura A. (2019, May).
   Tissue regulatory T cells and neural repair.

Int Immunol. 21;31(6), 361-369.

2. Sakai R, Komai K, Iizuka-Koga M, Yoshimura A, Ito M. (2020, Mar).
   Regulatory T Cells: Pathophysiological Roles and Clinical Applications.
   Keio J Med. 25;69(1), 1-15.
3. Ando M, Ito M, Srirat T, Kondo T, Yoshimura A. (2020, Mar).
   Memory T cell, exhaustion, and tumor immunity.
   Immunol Med. 43(1), 1-9.
4. 伊藤 美菜子，中村 敏弘，Srirat Tanakorn，吉村 昭彦. (2019, Jun).
   脳梗塞後の無菌性炎症における自然免疫と獲得免疫.
   炎症と免疫，27(4), 266-272.
5. 伊藤 美菜子，駒井 恭子，吉村 昭彦．(2019, Aug).
   脳損傷の修復における自然免疫と獲得免疫.
   実験医学，37(13), 2104-2111.
6. 伊藤 美菜子，山本 伸一，吉村 昭彦．(2019, Dec).
   組織 Treg と組織修復.
   臨床免疫・アレルギー科，72(6), 575-582.
7. 伊藤 美菜子．(2019, Dec).
   脳梗塞後慢性期における制御性 T 細胞による組織修復メカニズムの解明.
   神経化学，58(2), 79-83.

学会発表

1. Minako Ito, Akihiko Yoshimura.　(2019, 7/4 - 7).
   The role of Brain regulatory T cells during the chronic phase after CNS injury.
   Brain & Brain Pet 2019，Yokohama.
2. 伊藤 美菜子，吉村 昭彦．(2019, 7/16 - 17).
   中枢神経系疾患における制御性 T 細胞による組織修復機構の解明.
   第 40 回日本炎症・再生医学会，神戸.
3. 伊藤 美菜子，吉村 昭彦．(2019, 8/2 - 3).
   脳内炎症における制御性 T 細胞の意義の解明.
   第 84 回日本インターフェロン・サイトカイン学会各術集会，神戸.
4. 伊藤 美菜子，吉村 昭彦．(2019, 12/3 - 6).
   脳内炎症における脳特異的制御性 T 細胞の分化機構の解明.
   第 42 回日本分子生物学会年会，福岡.

防御分子構築学分野
Division of Molecular Design

Ⅰ．客員教授：山﨑　晶　Professor：Sho Yamasaki, Ph.D.

当分野では，免疫受容体を介した異物認識機構解明をテーマに研究を進めている．特に，病原体や損傷自己成分を認識するレクチン受容体に着目し，我々の免疫系が様々な「危機」から体を守るメカニズムの解明を目指すと共に，効率的な免疫賦活化，並びに，過剰な免疫応答に伴う疾患の治療に繋げる努力を続けている．

Ａ．免疫受容体による異物認識機構と免疫応答

生体は，様々な外敵から宿主を守るため，様々な免疫受容体を獲得してきた．免疫受容体としては，迅速で単純な応答を惹起する自然免疫受容体，複雑な応答を誘導する獲得免疫受容体が知られていた．一方，近年，その中間的な性質を有する受容体，レクチン受容体ファミリーが明らかとなってきた．当分野では，レクチン受容体が「損傷自己」「非自己病原体」の双方を認識し，生体の「危機」を感知するセンサーとして働いていることを見出してきた．また，このファミリーに属する受容体遺伝子が遺伝子重複によってクラスターを形成し，共に結核菌を認識して免疫賦活に寄与する受容体群であることを見出した．本分野では，新規免疫受容体とリガンドの同定，その正常な認識機構の解明と破綻に基づく免疫疾患発症機序の理解，レクチン分子による異物認識の普遍的原理の解明を進めると共に，これらの研究成果に基づく新たな免疫賦活法，制御法の開発を目指している．

業績目録

原著論文

1. Smith DGM, Hosono Y, Nagata M, Yamasaki S, Williams SJ. (2020).
   Design of potent Mincle signalling agonists based on an alkyl β-glucoside template.
   Chem Commun (Camb). in press.
2. Omahdi Z, Horikawa Y, Nagae M, Toyonaga K, Imamura A, Takato K, Teramoto T, Ishida H, Kakuta Y, Yamasaki S. (2020, Mar).
   Structural insight into the recognition of pathogen-derived phosphoglycolipids by C-type lectin receptor DCAR.
   J Biol Chem. in press.

3. Zhang S, Liu H, Yin M, Pei X, Hausser A, Ishikawa E, Yamasaki S, Jin ZG. (2020, Feb).
   Deletion of Protein Kinase D3 Promotes Liver Fibrosis in Mice.
   Hepatology in press.
4. Kamohara A, Hirata H, Xu X, Shiraki M, Yamada S, Zhang JQ, Kukita T, Toyonaga K, Hara H, Urano Y, Yamashita Y, Miyamoto H, Kukita A. (2020, Feb).
   IgG immune complexes with Staphylococcus aureus protein A enhance osteoclast differentiation and bone resorption by stimulating Fc receptors and TLR2.
   Int. Immunol. 32(2), 89-104.
5. Suematsu R, Miyamoto T, Saijo S, Yamasaki S, Tada Y, Yoshida H, Miyake Y. (2019, Nov).
   Identification of lipophilic ligands of Siglec5 and -14 that modulate innate immune responses.
   J. Biol. Chem. 294(45), 16776-16788.
6. Tanno D, Yokoyama R, Kawamura K, Kitai Y, Yuan X, Ishii K, De Jesus M, Yamamoto H, Sato K, Miyasaka T, Shimura H, Shibata N, Adachi Y, Ohno N, Yamasaki S, Kawakami K. (2019, Dec).
   Dectin-2-mediated signaling triggered by the cell wall polysaccharides of Cryptococcus neoformans.
   Microbiol. Immunol.63(12), 500-512.
7. Braganza CD, Shibata K, Fujiwara A, Motozono C, Sonoda KH, Yamasaki S, Stocker BL, Timmer MSM. (2019, Oct).
   The effect of MR1 ligand glyco-analogues on mucosal-associated invariant T (MAIT) cell activation.
   Org. Biomol. Chem. 17(40), 8992-9000.
8. Haider M, Dambuza IM, Asamaphan P, Stappers M, Reid D, Yamasaki S, Brown GD, Gow NAR, Erwig LP. (2019, Aug).
   The pattern recognition receptors dectin-2, mincle, and FcRγ impact the dynamics of phagocytosis of Candida, Saccharomyces, Malassezia, and Mucor species.
   PLoS One. 14(8), e0220867.
9. van der Peet PL, Gunawan C, Watanabe M, Yamasaki S, Williams SJ. (2019, Jul).
   Correction to "Synthetic β-1,2-Mannosyloxymannitol Glycolipid from the Fungus Malassezia pachydermatis Signals through Human Mincle".
   J. Org. Chem. 84(14), 9393-9394.
10. Ishifune C, Tsukumo SI, Maekawa Y, Hozumi K, Chung DH, Motozono C, Yamasaki S, Nakano H, Yasutomo K. (2019, May).
    Regulation of membrane phospholipid asymmetry by Notch-mediated flippase expression controls the number of intraepithelial TCRαβ+CD8αα+ T cells.

PLoS Biol. 17(5), e3000262.

11. van der Peet PL, Gunawan C, Watanabe M, Yamasaki S, Williams SJ. (2019, Jun).
Synthetic β-1,2-Mannosyloxymannitol Glycolipid from the Fungus Malassezia pachydermatis Signals through Human Mincle.
J. Org. Chem. 84(11), 6788-6797.

12. Matsumura T, Ikebe T, Arikawa K, Hosokawa M, Aiko M, Iguchi A, Togashi I, Kai S, Ohara S, Ohara N, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Takeyama H, Yamasaki S, Takahashi Y, Ato M. (2019, Apr).
Sequential Sensing by TLR2 and Mincle Directs Immature Myeloid Cells to Protect against Invasive Group A Streptococcal Infection in Mice.
Cell Rep. 27(2), 561-571.e6.

13. Reinink P, Buter J, Mishra VK, Ishikawa E, Cheng TY, Willemsen PTJ, Porwollik S, Brennan PJ, Heinz E, Mayfield JA, Dougan G, van Els CA, Cerundolo V, Napolitani G, Yamasaki S, Minnaard AJ, McClelland M, Moody DB, Van Rhijn I. (2019, Apr).
Discovery of Salmonella trehalose phospholipids reveals functional convergence with mycobacteria.
J. Exp. Med. 216(4), 757-771.

総説

1. 豊永憲司，山崎晶.（2019 年 6 月）.
C 型レクチン受容体のリガンド認識と免疫調節機構.
医学のあゆみ. 269(9), 743-748.

著書

1. Miyake Y, Yamasaki S. (2020).
Immune Recognition of Pathogen-Derived Glycolipids Through Mincle.
Adv Exp Med Biol. 1204:31-56.

学会発表

1. 山崎晶. (2019, 4/23-25).
慢性炎症を誘導する細菌由来脂質の同定.
第 92 回日本細菌学会総会，札幌.

2. 山崎晶. (2019, 7/4-5).
レクチン受容体を介する糖脂質認識と免疫調節機構.
第 61 回日本脂質生化学会，北海道.

3. 山崎晶. (2019, 6/17-21).
Sensing infectious and injurious stimuli by immune receptors for lipids.
60th International Conference on the Bioscience of Lipids，東京.
4. Sho Yamasaki. (2019, 6/27-28).
Sensing environmental lipids and metabolites via immune receptors.
The 1st UCL-OU Joint Symposium on Immunology (阪大 UCL 合同シンポジウム)，大阪.
5. 松村隆之，山崎晶，高橋宜聖，阿戸学．(2019, 8/28-29).
劇症型 A 群レンサ球菌感染症におけるシークエンシャル・センシング機構.
第 31 回微生物シンポジウム，京都.
6. Sho Yamasaki. (2019, 8/25-31).
Recognition of bacterial glycolipids via host immune receptors.
25th International symposium on glycoconjugates, Italy.
7. Takayuki Matsumura, Sho Yamasaki, Yoshimasa Takahashi, Manabu Ato．(2019, 9/10-13).
The TLR2/IL-6/Mincle axis in IFN-γ-producing immature myeloid cells is essential to protect against severe invasive *Streptococcus* infection.
The 18th Awaji International Forum on infection and Immunity, Awaji.
8. 山崎晶．(2019, 9/18-20).
レクチン受容体を介する糖脂質認識と免疫調節機構.
第 92 回日本生化学会大会，横浜.
9. Sho Yamasaki. (2019, 10/4-6).
Lipid recognition through Immune receptors.
International ITU Molecular Biology and Genetics Student Congress’19, Turkey.
10. Sho Yamasaki. (2019, 10/30-11/1).
Regulation of immune responses via glycolipid sensors.
KAI International Meeting 2019, Korea.
11. Sho Yamasaki. (2019, 11/6-8).
Sensing injurious stimuli by immune receptors for lipid.
9th International DAMPs and Alarmins Symposium, Okayama.
12. Sho Yamasaki. (2019, 11/11-14).
Sensing infectious and injurious stimuli by C-type lectin receptors.
11th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology), Korea.
13. 鳥越祥太，山崎晶．(2019, 11/16-17).
免疫賦活作用を有する結核菌親水性成分の解析.
第 4 回抗酸菌研究会，東京.
14. 豊永憲司，原博満，山崎晶．(2019, 11/16-17).

BCG 感染における Card9 の機能解析.
第 4 回抗酸菌研究会，東京.

15. 石塚茂宜，西村直矢，豊永憲司，宮本友司，山崎晶．(2019, 11/16-17).
C 型レクチン受容体による結核菌糖脂質 PGL-tb の認識.
第 4 回抗酸菌研究会，東京.

16. 山崎晶．(2019, 11/19).
Bacterial lipids promote deleterious inflammation through C-type lectin receptors.
千葉大学真菌医学研究センターMonthly セミナー，千葉.

17. Chihiro Motozono, Hendra Saputra Ismanto, Kensuke Shibata, Sho Yamasaki. (2019, 12/11-13).
Capturing and identification of MR1-binding molecules using unfolded MR1 protein.
第 48 回日本免疫学会学術集会，浜松.

18. Xiuyuan Lu, Masatsugu Oh-hora, Sho Yamasaki. (2019, 12/11-13).
Negative regulation of IL-10 transcription by calcium signaling in dendritic cells.
第 48 回日本免疫学会学術集会，浜松.

19. Miyuki Watanabe, Sho Yamasaki. (2019, 12/11-13).
FcRγ-coupled receptors induce different cytokines by altering the kinetics of FcRγ signaling.
第 48 回日本免疫学会学術集会，浜松.

20. Zakaria Omahdi, Yuto Horikawa, Kenji Toyonaga, Akihiro Imamura, Hideharu Ishida, Yoshimitsu Kakuta, Sho Yamasaki. (2019, 12/11-13).
Structural basis for the recognition of mycobacterial phospholipids by C-type lectin receptors in the host.
第 48 回日本免疫学会学術集会，浜松.

21. Naoya Nishimura, Shota Torigoe, Chihiro Motozono, Satoru Mizuno, Kazuhiro Matsuo, Sho Yamasaki. (2019, 12/11-13).
The suppression of host immune responses by mycobacteria through inhibitory C-type lectin receptors.
第 48 回日本免疫学会学術集会，浜松.

22. Shojiro Haji, Takashi Shimizu, Taiki Ito, Sho Yamasaki. (2019, 12/11-13).
Intercellular communication between hematopoietic cells through Dectin-1.
第 48 回日本免疫学会学術集会，浜松.

23. 山崎晶．(2020, 1/30).
レクチン受容体を介する糖鎖認識と免疫調節機構.
第 128 回 OICI セミナー，大阪.

24. Miyuki Watanabe, Sho Yamasaki. (2020, 2/27).
FcRγ-coupled receptors induce different cytokines by altering the kinetics of FcRγ signaling.
The 8th ITAM Workshop, 東京.
25. Kenji Toyonaga, Hiromitsu Hara, Sho Yamasaki. (2020, 2/27).
Analysis of Card9 function in Mycobacterium bovis BCG infection.
The 8th ITAM Workshop, 東京.

II．客員准教授：揚妻　正和　Associate Professor：Masakazu Agetsuma, Ph.D.

当部門では，「光学技術（光神経活動イメージング，光遺伝学など)」を開発・応用することで，情動を司る脳内情報処理様式の解明，そしてそこから精神疾患治療への新たな応用法の提案を目指している．本年度は情動記憶に関わる *in vivo* 神経活動イメージング，およびそれにより得られたデータの数理解析を中心に展開した．加えて，それら観察により検知された特徴的な変化の因果性を検証するために，光遺伝学をベースにした新たな光学系を構築した．その他，発光イメージングによる新規脳活動観察法の開発，および脳挿入用薄型 CMOS pH イメージングセンサーの開発をそれぞれ論文として発表した．

A．情動記憶に関する *in vivo* 神経活動イメージングと光遺伝学的活動操作

マウスの「内側前頭前野（mPFC)」はヒトの前頭前野背外側部に相当すると言われ，報酬記憶・嫌悪記憶といった様々な情動に関する記憶の管理を担う．

大脳皮質での情報処理においては，神経細胞集団は全体として精密に制御されなければならないことがこれまでに示唆されている．一方，実際どのような制御が脳機能の達成に重要であるかについては，情報論的な概念や仮説が提唱されるにとどまっている場合が多い．当部門ではこれまで，2 光子神経活動イメージング技術によりこの問題に着手し，さらに光遺伝学的な神経活動操作を同時に行う手法を確立することで，大脳皮質での神経集団による情報コーディング（population coding）の基盤について明らかにしてきた（Agetsuma et al., Cerebral Cortex, 2018）．現在はこれらの技術を応用し，擬似自由行動中のマウスにおける神経集団活動の経時的な計測と操作を行うことで，神経細胞集団による情動記憶の情報処理基解明を目指している．

観察対象部位としては，恐怖記憶との関連が指摘され，トップダウン的に恐怖反応を引き起こすと考えられている mPFC に着目している．多数の神経細胞からの活動記録を実現するために，2 光子神経活動イメージングを行った．すでに導入されているオリンパス社の多光子励起レーザー走査型顕微鏡 FVMPE-RS を利用し，レゾナントスキャナにより～200Hz の速度での観察を実現した．

過去の研究で，mPFC の一部，前辺縁皮質（PL）では，学習依存的な恐怖反応に伴って，神経活動の上昇が報告されている．すなわち，音と電気ショックの組み合わせで恐怖条件付けを行った場合，条件刺激である音に対しての神経活動は，学習の成立に伴い増加する（Sotres-Bayon and Quirk, Curr. Opin. Neurobiol., 2010）．一方，本能的なすくみ行動には関係がないことが知られており，学習依存的に PL での情報処理様式が変化し，そしてその「出力結果」として恐怖反応を引き起こしていると考えられる．それを受け，深部イメージングを行うための光学系・実験手法を確立し，PL を中心とした mPFC からの神経活動観察を進めた．遺伝子コード型カルシウムセンサーの

利用により，長期的に細胞を標識し，同一の神経細胞群における学習経過を通じた神経発火パターンの変化についてのデータ取得を取得した．

さらにそこから，イメージングデータの解析による記憶コードに関する特徴抽出を進めている．これまでのところ，単一神経細胞レベル，及び神経細胞群としての両方のレベルにおいて，学習の前後では単に活動が上昇するということのみならず，様々な活動変化が起こることを見出した．神経細胞集団としての役割にも着目している．

今後は解析をさらに進めるのみならず，光遺伝学的手法を利用することで，それらの特徴の人工的な活性化および抑制を行い，その因果性を検証していく．光遺伝学的な手法と SLM 技術などを組み合わせることで，任意の神経活動パターンを作ることが可能となる（Packer et al.，2014）．この目的のための光学系は概ね完成しており，上記解析から見出した要素の重要性を直接的に検証していく計画である．

B．発光イメージングによる自由行動中のマウスからの活動観察

電位プローブは，細胞の膜電位変化を直接可視化できるため，パッチクランプ法等の従来の電気生理学的手法では困難であった，1）subcellular レベルの細胞内電位変化の観察や，2）脳や心臓など多細胞組織における領域ごとの膜電位変化の詳細な計測，など新たな観察を可能としている．

これまで，蛍光色素やタンパク質を用いた様々な電位プローブが発表されてきている．膜電位感受性色素は，非常に明るい上，反応速度が速く，大脳皮質等におけるマクロな電気的活動計測に利用されてきた．しかし，神経細胞もグリア細胞も非特異的に染色し，また染色の度合いをコントロールするのが難しいなどの理由で，観察対象の特定や再現性に問題があった．そこで細胞種特異的な発現制御の可能なタンパク質プローブの開発が現在盛んに行われており，膜電位感受性ホスファターゼの膜電位感受性ドメインや，古細菌型ロドプシンを基にした高性能なプローブがいくつも報告されてきている．近年は特に古細菌型ロドプシンを利用したプローブの性能向上が著しく，長所である優れた反応速度を維持しながらも，欠点であった *in vivo* における SN 比の低さも克服しつつある．

これら蛍光型膜電位プローブの発展型として，当部門では大阪大学・永井研究室との共同研究として「生物発光」を用いたプローブの開発に取り組んできた．生物発光（発光機序より，以下化学発光という）イメージングでは，蛍光イメージングで問題になる背景光による影響がないため，特に動物個体や組織標本など厚みのある標本で高い画像コントラストが得られる．近年，我々は，化学発光タンパク質を利用することで，世界初となる化学発光膜電位指示タンパク質（LOTUS-V）の開発に成功した（Inagaki et al.，2017）．LOTUS-V により，励起光照射なしで神経細胞の活動電位が検出可能であり，なおかつ比率測定型のプローブなため，観察対象の「動き」にも強い．

これを用いた実験により，自由行動中のマウス第一次視覚野（V1）神経細胞において，フィールド電位を高感度に計測することが実現，論文として報告した（Inagaki, Agetsuma et al., 2019）．蛍光プローブにより自由行動中の動物で計測を行う際，複数のマウスを同じケージ内におくと，蛍光の励起・検出用に頭部に繋げているファイバーが絡まることが問題となる．しかし，LOTUS-V を用いた計測ではそのためのファイバーが必要ないため，これらの利点を利用することで，複数マウスにおける同時計測が実現した．

この計測法によって，マウスが互いに接触する際，すなわち社会性行動に際し，視覚の中枢 V1 の活動が優位に上昇することを新たに発見している（Inagaki, Agetsuma et al., 2019）．今後は，社会性行動を制御する脳機能などの新たな発見へとつながること期待される．

C．脳挿入型 CMOS センサーによる脳内 pH のリアルタイム観察

健康な脳内の pH は，生体が恒常性を維持しようとするメカニズムにより，ある範囲内で厳密に調節されている．一方，てんかんや脳虚血などの病気では，脳細胞の外側で pH が大きく範囲を超えて変化し，脳の異常活動を引き起こすことから，病気と pH の関連性が指摘されてきた．従来の pH を計測する方法は，pH 電極を用いた極めて局所の「点」の計測に限られてきた．そのため，計測箇所以外の領域において，pH がどのように違うのか，脳の活動に応じて pH が時空間的にどのように変化しているかなどの大域的な情報は得られなかった．これまで核磁気共鳴画像法（MRI）を用いた pH イメージングの手法はあったものの，脳神経活動がミリ秒単位で起こることや神経細胞体の大きさが約 50μm であることを考えると，その時空間分解能はとても低く（時間分解能６秒，空間分解能 4mm），神経活動によって起きる素早い pH 変化を計測することは困難であり，神経細胞や局所神経ネットワークレベルの空間スケールでの変化が見落とされていた可能性があった．

そこで，新たな高時空間分解能を持つ生体イオンイメージングツールとして，高精細生体 pH イメージセンサーを開発することに成功した（Horiuchi, Agetsuma et al., 2020）．今回開発したセンサーは時間分解能 20 ミリ秒，空間分解能 23.55μm という非常に高い時空間分解能に加え，センシングエリアの小型・薄型化によって，マウスなどの小動物の小さな脳にも使用することが可能である．また，小型ながら幅.072mm，長さ 3.00mm というセンサー範囲を確保することで，生きたマウスの脳内において pH イメージングを行うことが可能となった．

神経活動に伴う脳内 pH の変化が，どれくらいの時空間スケールで生じているかを検証するため，さまざまな視覚パターンをマウスに見せ，その際の一次視覚領域における pH 変化を観察した．その結果，視覚パターンごとに異なる脳内空間パターンで pH 変化が観察された．さらに，変化のあった領域に注目することで，神経活動によって

脳内 pH がミリ秒単位の時間スケールで刻々と変化することを明らかにした.

業績目録

原著論文

1. Horiuchi H.†, Agetsuma M.†, Ishida J., Nakamura Y., Cheung L. D., Nanasaki S., Kimura Y., Iwata T., Takahashi K., Sawada K.*, Nabekura J.* (2020, Feb).
   CMOS-based bio-image sensor spatially resolves neural activity-dependent proton dynamics in the living brain.
   Nat Commun. 11, Article number 712. (†: equal contribution)(*: Corresponding author)
2. Inagaki S.†, Agetsuma M.†, Ohara S., Iijima T., Yokota H., Wazawa T., Arai Y., Nagai T. (2019, May).
   Imaging local brain activity of multiple freely moving mice sharing the same environment.
   Sci Rep. 9, 7460. (†: equal contribution)

学会・国際会議での発表（口頭）

1. 揚妻 正和. (2019, 8/25).
   光と機械学習による恐怖記憶情報処理機構の解明.
   第 3 回和光－精神神経懇話会，筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構（WPI-IIIS）.
2. Masakazu Agetsuma. (2019, 10/30).
   Multimodal functional brain imaging in mice and cortical computation.
   Okazaki-Tuebingen-Beijing symposium, Conference Room (1F) of National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan.
3. Masakazu Agetsuma. (2020, 2/13).
   Population coding of fear memory in prefrontal cortex.（招待講演）
   MACS International Symposium: COMPUTATIONAL PRINCIPLES IN ACTIVE PERCEPTION AND REINFORCEMENT LEARNING IN THE BRAIN, 京都大学　北部キャンパス　セミナーハウス.
4. Agetsuma M., Sato I., Tanaka Y., Kasai A., Arai Y., Yoshitomo M., Hashimoto H., Nabekura J., Nagai T. (2020, 3/18).
   他学会連携シンポジウム「データ駆動型知能を用いた神経科学の現状と展望」（chair としてシンポジウム開催）
   (口頭発表演題：Optical and computational dissection of neural circuit for fear memory)
   第 97 回日本生理学会大会，誌上開催.

防御システム再生学分野

Division of Regeneration Biology

客員教授：鈴木　聡

Professor：Akira Suzuki, M.D., Ph.D.

がんは死因の第１位であり,かつ依然増加の一途をたどり,人類にとって最も脅威な疾患である.当分野では分子生物学,細胞生物学・発生工学等の技術を駆使して,**「がん関連遺伝子の機能とその破綻病態の解明,およびがん関連遺伝子を標的とする治療薬開発」**の研究を行っている.

多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常は,がんの発症進展のみならず,がん以外の多くの主要な疾患の発症や,個体の発生・分化にも深く関わっていることが分かってきた.このことから,がん関連遺伝子研究はがんのみならず,生活習慣病等の多くの疾患の治療法開発につながることが期待される.

私たちはこれらがん関連遺伝子の中でも,最近注目されつつある Hippo 経路,がん抑制遺伝子の代表格である p53 や PTEN の機能やその制御機構を解析し,これら遺伝子を標的とする新規治療薬開発にも取り組んでいる.

我々の研究によって,がんを含む多くの疾患の発症・進展機構が解明されるとともに,新規治療薬を開発して,医療に貢献したい.

Ａ．Hippo 経路遺伝子群の機能解析研究

細胞間コミュニケーションには,液性因子起因性シグナルと細胞接触起因性シグナルが大切である.液性因子起因性シグナルはこれまで飛躍的に解析されてきたものの,細胞接触シグナルはまだ不明な点が多い.特に隣の細胞との接触によって細胞増殖が抑制される接触抑制現象（コンタクトインヒビション）は古くから知られていたものの,その分子機構は未だ殆ど不明であった.近年,接触抑制シグナルの鍵経路として,またがん抑制シグナルとして Hippo キナーゼ経路が脚光を浴びている.

Hippo 経路はショウジョウバエにおいて初めて見出され,接触抑制,細胞増殖,細胞死,幹細胞維持,細胞遊走,器官サイズの制御シグナルとして注目されている.生化学的には細胞接触,ストレス刺激, 柔軟な細胞外マトリックス時などに,MST キナーゼが活性化された後,LATS キナーゼが活性化され,活性化した LATS キナーゼは,細胞増殖に正に働く転写共役因子 YAP1/TAZ をリン酸化して,核から排除し,或いは蛋白質崩壊に導くことによって,主に細胞増殖に作用する標的遺伝子の転写を負に制御する.しかしながら哺乳類では Hippo 経路各分子の相同分子が極めて多い為に Hippo キナーゼ経路上のどの分子がどの作用に最も大切であるかを明らかにすることが急務である.さらにこれまでに

作製された Hippo 経路遺伝子欠損マウスの多くは胎生早期に致死であったため,成体における Hippo 経路各分子の生理的役割やその破綻による腫瘍発症の有無の多くが不明であった.そこで我々は接触抑制の鍵経路である Hippo キナーゼ経路に興味を持ち,この経路が発生に必須であること,外毛根鞘がんや混合性肝がんの原因遺伝子経路の一部は Hippo 経路であること,がん以外に軟骨異形成症の原因となりうること, MOB1 はこれら Hippo 経路のハブとして作動し,内因性 YAP を最も強力に制御できることを報告するとともに,YAP/TAZ 活性を抑制可能な天然物も提示してきた.

2019 年度には,T 細胞特異的な MOB1 欠損は,ナイーブ T 細胞数が減少すること,これは CCL19 等のケモカインに対する反応性が障害されて,胸腺から末梢への遊出障害によること,これらの反応は YAP 非依存性であること,など Hippo 経路異常による免疫不全の原因の一端を示した. (Genes Cells, 2019)

その他,マウス舌上皮でMOB1を欠損し,YAPが強く活性化すると,直ち(約1週間以内)にがんが発症した（世界最速発がんモデルマウス). またヒトにおいて,YAP は頭頚部がん発症前の異形成（前がん病変）の時期から高値になり,がんが発症・進展するに従ってさらに高値になっていくこと,また YAP が高値になるほど生命予後も悪くなることを示した. 本マウスにみられる頭頚部がんの発症や進展,さらにヒト頭頚部がんの細胞株の細胞増殖は,YAP 依存性であった.本研究成果から,YAP 活性が閾値を超えたときに直ちにがんが発症する可能性が考えられ,頭頚部がんの発症や進展の機構は,YAP を基軸として考える必要があるとするパラダイムシフトを提唱した.本マウスは,頭頚部がんに対する新薬の開発研究だけでなく,一般的ながん研究に絶好の資源となる. YAP 阻害は頭頚部がんの発症や進展を抑制することから, YAP 経路は頭頚部がんの治療に向けた薬剤の良い標的となる. (Science Advances, 2020)

その他, YAP を標的とする薬剤開発では, YAP 蛋白質量を低下させる新規低分子化合物を２種, YAP 蛋白質低下は示さないものの YAP による転写活性を低下させるヒット化合物２種類を見出し, その解析を続けている.

Ｂ．PTEN の機能解析研究

我々はこれまでにがん抑制遺伝子 PTEN 欠損が引き起こす種々のがんや種々のがん以外の疾患の発症に関与することを明らかにしてきた.

PTEN の異常は遺伝子変異よりも蛋白質量や酵素活性低下による事が多い.また PTEN 蛋白質量を軽度上昇させたトランスジェニックマウスでは個体寿命も顕著に延長する.そこでPTENの分解に関わる既存ユビキチンリガーゼ5種のうち,最も強力なものはWWP2であったため,現在 PTEN と WWP2 の直接結合を阻害する低分子化合物スクリーニングのための TR-FRET 系を樹立し,現在約 30000 種類の低分子化合物をスクリーニング中である.

一方 PTEN-EGFP 発現細胞に,Crisper/Cas9 システムでバーコードを含む sgRNA ライブラリーを作用させ,PTEN の発現が高くなった細胞をソート後 導入された sgRNA を バーコードを頼りに次世代シークエンスで解析して,PTEN を不安定化する新規分子のスクリーニングを終え, この標的分子に対する異なる sgRNA でも PTEN を安定化することを確認して, その序列もつけた (生医研 須山幹太先生との共同研究) . これらのうち PTEN の蛋白質量を最も変化させた５種の分子を選択し,これら分子による PTEN の制御機構を現在解析中である.

Ｃ．P53 を制御する核小体ストレス経路の機能解析研究

p53 の安定化機構は,DNA ストレス(DNA 障害)や発がんストレス(Ras などがん遺伝子活性化)による機構が主に解析されてきたが,近年これらに加えて,核小体ストレスによる機構が脚光をあびている.核小体ストレス時には,核小体に存在する一部のリボゾーム蛋白質(RPL11 など)が核質へ移行し,核質の MDM2 と結合することにより MDM2 の機能を低下させ p53 が安定化する.

我々は,PICT1 の作用を初めて同定,命名し,(ｱ)この分子が RPL11 を核小体に繋留する核小体蛋白質であること,(ｲ)核小体ストレス下では PICT1 が速やかに崩壊消失することで,RPL11 が核小体から核質へ局在変化し,これによって核小体ストレス経路が活性化されて細胞死を導くこと,(ｳ)PICT1 が発現低下した,p53 に変異のない癌患者は,著しく予後良好であること等を報告した.これらのことから,PICT1 と RPL11 の結合阻害剤は,新しい作用機序の p53 安定化薬剤として,p53 変異のないがんに対する抗腫瘍薬になる可能性がある.

そこで PICT1 と RPL11 の結合可視化系を TR-FRET 法で構築し,これを用いてこれら 2 分子の結合を阻害して p53 を活性化させる低分子化合物２種類を見出した.現在化合物の最適化のために, その構造類縁体を解析している.

また,質量分析解析で同定した PICT1 と結合する蛋白質 49 種類の中から,PICT1 と直接結合して PICT1 の蛋白質安定化に関わる新規分子も見出し, これらが rRNA や PICT1 と結合し,p53 の安定化制御に関わる分子であることを見出した. 現在, この新規分子が PICT1 を安定化する機構を解析中である.また,PICT1 と新 PICT１安定化分子の結合可視化系を,TR-FRET 法で構築したので,この結合を阻害して p53 を活性化させる低分子化合物の一次スクリーニングも進行中である.

業績目録

原著論文

1. Kato W, Nishio M, To Y, Togashi H, Mak TW, Takada H, Ohga S, Maehama T, Suzuki A. (2019, Jul).
   MOB1 regulates thymocyte egress and T-cell survival in mice in a YAP1-independent manner.
   Genes Cells 24(7), 485-495.
2. Mukohyama J, Isobe T, Hu Q, Hayashi T, Watanabe T, Maeda M, Yanagi H, Qian X, Yamashita K, Minami H, Mimori K, Sahoo D, Kakeji Y, Suzuki A, Dalerba P, Shimono Y. (2019, Oct).
   miR-221 Targets QKI to Enhance the Tumorigenic Capacity of Human Colorectal Cancer Stem Cells.
   Cancer Res. 79(20), 5151-5158.
3. Kobayashi T, Uegaki M, Kita Y, Shirakawa R, Teramoto Y, Kamiyama Y, Saito R, Yoshikawa T, Sakamoto H, Goto T, Akamatsu S, Yamasaki T, Inoue T, Suzuki A, Horiuchi H, Ogawa O. (2019, Dec).
   Downregulation of RalGTPase-activating protein promotes invasion of prostatic epithelial cells and progression from intraepithelial neoplasia to cancer during prostate carcinogenesis.
   Carcinogenesis 40(12), 1535-1544.
4. Ishihara E, Nagaoka Y, Okuno T, Kofuji S, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Kamimura K, Terai S, Yokomizo T, Sugimoto Y, Fujita Y, Suzuki A, Nishina H. (2020, Mar).
   Prostaglandin E2 and its receptor EP2 trigger signaling that contributes to YAP-mediated cell competition.
   Genes Cells 25(3), 197-214.
5. Omori H, Nishio M, Masuda M, Miyachi Y, Ueda F, Nakano T, Sato K, Mimori K, Taguchi K, Hikasa H, Nishina H, Tashiro H, Kiyono T, Mak TW, Nakao K, Nakagawa T, Maehama T, Suzuki A. (2020, Mar).
   YAP1 is a potent driver of the onset and progression of oral squamous cell carcinoma.
   Sci Adv. 6(12), eaay3324.

学会発表等

1. 西尾美希，宮地洋佑，大谷淳二，前濱朝彦，鈴木 聡．(2019, 6/28-6/29).
   Hippo シグナル経路による細胞競合機構.
   第 18 回生命科学研究会，東京．（口頭）
2. 久野舟平，勝沼紗矢香，鈴木 聡，富樫 英．(2019, 6/24-6/26).
   ネクチンのヘテロフィリックな相互作用によるモザイク様の細胞パターン形成では接着力

と収縮力の偏りが割込みを駆動する.
第 19 回日本蛋白質科学会 第 71 回日本細胞生物学会 合同年次大会，神戸.（ポスター）

3. 前濱朝彦，西尾美希，宮地洋佑，大谷淳二，上田史仁，富樫 英，鈴木 聡.(2019, 7/5-7/6).
Hippo シグナル経路による細胞競合機構.
第 9 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会，札幌，（口頭）

4. 前濱朝彦，西尾美希，藤 庸子，清野 透，田代浩徳，鈴木 聡.(2019, 9/18-9/20).
子宮頸がん発症における Hippo 経路の役割.
第 92 回日本生化学会大会，横浜.（ポスター）

5. 益田宗幸，大森裕文，佐藤晋彰，田口健一，鈴木 聡.(2019, 9/26-9/28).
YAP1 トランスクリプショナルアディクションは頭頸部癌進化のドライビングフォースである（Transcriptional addiction to YAP1 -the major driving force of head and neck cancer evolution?-）.
第 78 回日本癌学会学術総会，京都.（ポスター）

6. 宮地洋佑，大森裕文，西尾美希，益田宗幸，鈴木 聡.(2019, 9/26-9/28).
Hippo-YAP1 シグナルによる頭頸部扁平上皮がんの発症および進展の制御（Hippo-YAP1 signaling drives head-and-neck squamous cell carcinoma onset and progression）.
第 78 回日本癌学会学術総会，京都.（ポスター）

7. 渋谷尚樹，下野洋平，南 博信，掛地吉弘，鈴木 聡.(2019, 9/26-9/28).
ヒト乳がん異種移植モデルの微小転移がん幹細胞で発現低下している マイクロ RNA-93 の解析.
第 78 回日本癌学会学術総会, 京都.（ポスター）

8. Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Akira Suzuki. (2019, 12/2-12/3).
The tumor suppressor PTEN: its function and regulation.
Tohoku Forum for Creativity（シンポジウム），仙台.（口頭）

9. 前濱朝彦，宮地洋佑，西尾美希，大谷淳二，上田史人，鈴木 聡.(2019, 12/3-12/6).
核小体ストレス―RNA を介した応答機構.
第 42 回日本分子生物学会年会，福岡．ワークショップ（口頭）

10. Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Yosuke Miyachi, Akira Suzuki. (2019, 12/3).
Regulation of nucleolar stress response and tumorigenesis by PICT1.
International Symposium: Frontiers of Cell, Signaling in 2019，神戸.（口頭）

11. 加藤稚子，石村匡崇，西尾美希，前濱朝彦，大賀正一，鈴木 聡.(2020, 2/16).
Hippo 経路分子 MOB1 による T 細胞の遊走と細胞死の制御.
第 3 回 日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会.（口頭）

12. 西尾美希，前濱朝彦，鈴木 聡．(2020, 2/4-2/5).
がん抑制遺伝子の機能解析.
2019 年度【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会．基調講演（口頭）