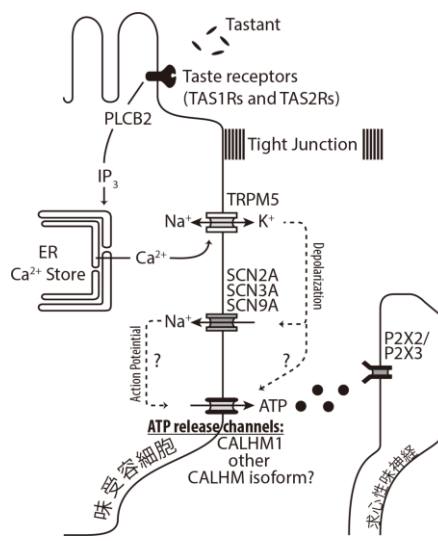


別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	細胞生理	講師	樽野 陽幸
研究の名称	CALHM1/CALHM3ヘテロメリックイオンチャネルによる味覚の神経伝達		
研究のキーワード (注1)	味覚・味蕾・神経伝達・イオンチャネル		
研究の概要 (注2)	<p>本研究は、味蕾での味覚神経伝達の分子機構解明を目指す研究であると同時に、CALHMイオンチャネルの生理機能の全容解明を目指す研究でもある。まずCALHMアイソフォームの中でもCALHM3に着目し、ヘテロメリックCALHM1/CALHM3チャネルの機能解析を哺乳類培養細胞株強制発現系を用いて行い、CALHM3がCALHM1の活性化機構・細胞内局在・翻訳後修飾に与える影響を明らかにした。また、マウス味蕾における<i>Calhm3</i> mRNAの発現細胞種を同定した。以上の結果より、ヘテロメリックCALHM1/CALHM3チャネルの味覚神経伝達における役割について、CALHM3が関与する味覚のモダリティ（質）や味細胞の興奮とCALHM1/CALHM3チャネル活性化の連関についての示唆が得られた。さらに、CALHM3の細胞内局在・生理機能を明らかにする為の遺伝子改変動物等の研究ツールの作製も行っており、本研究によって得られた結果・研究ツールは、味覚神経伝達機構の解明および将来のCALHM研究の発展に大いに資すると期待できる。</p>		
研究の背景	<p>calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1)は4回膜貫通型タンパク質で、ホモ6量体を形成して電位依存性ATP透過性イオンチャネルとして機能する。我々は先行研究において、CALHM1が哺乳類味蕾における甘味・苦味・うま味受容時の神経伝達物質ATPの放出経路の必須分子であることを突き止めた(Taruno et al. <i>Nature</i> 495:223,2013)。しかし同時に、CALHM1は味細胞ATP放出チャネルの必須構成分子であるが唯一の構成要素ではないこと(Taruno et al. <i>BioEssays</i> 35:1111,2013)、別のCALHMアイソフォームがCALHM1とヘテロメリックイオンチャネルを形成して味覚神経伝達に関わっている可能性が示唆されていた。</p>		



研究手法	(1) 哺乳類培養細胞株強制発現系を用いたパッチクランプ法、免疫細胞化学染色および共免疫沈降法・表面ビオチン化法など生化学的実験手法 (2) 遺伝子クローニング・変異導入など遺伝子工学的実験手法 (3) マウス組織を用いた <i>in situ hybridization</i> 法 (4) 抗ペプチドポリクローナル抗体の作製 (5) CRISPR/Cas9システムによる遺伝子改変マウスの作製
研究の進捗状況と成果	本研究の進捗状況は、順調である。計画通り、ヘテロメリックCALHM1/CALHM3イオンチャネルの機能解析を終え、味蕾におけるCALHM3の発現細胞を同定する事ができた。一方で、CALHM3の細胞内局在解析・機能解析に必要なツールの開発も順調に進んでおり、近く実験を開始できる。ここで得られた結果・開発するツールは、今後の研究の発展にとって極めて重要なものであり、十分な成果が得られたと言える。また、本研究は重要な生理機能を有する新規イオンチャネルの発見という側面からも注目を浴びており、総説論文・シンポジウムに招待され、そこで成果を発信してきた。
地域への研究成果の還元状況	特になし
今後の期待	これまでに、CALHM 遺伝子ファミリーの中でも特定のアイソフォームがイオンチャネル機能を有する事を明らかにし、味蕾におけるこれらのアイソフォームの発現細胞種の同定に成功してきた。今後、さらに研究をすすめて味蕾における味覚神経伝達の分子機構の全容解明が期待される。さらに、本研究において開発したツールを用いて CALHM 遺伝子の全身の各種臓器における発現部位を同定し、そこでの機能解析を行う事で、CALHM 遺伝子ファミリーの生理機能の全容が解明されると期待される。
研究発表 (注3)	(A) 総説論文 <u>英文総説 (査読有り)</u> 1. Foskett, J.K., Ma, Z., Siebert, A.P., Lamitina, T., Marambaud, P., Tanis, J.E., & Taruno, A. Calcium homeostasis modulator (CALHM) ion channels: structure, functions and physiological roles. <i>Membrane</i> 39 , 41-47, (2014). <u>和文総説 (査読無し)</u> 2. 樽野陽幸 , 丸中良典. 分子レベルで明らかになってきた舌で甘さを感じるしくみ. <i>砂糖類・でん粉情報</i> (農畜産業振興機構) 2015 年 1 月号, p41-45. (B) シンポジウム・招待講演・ワークショップ 3. Taruno, A. , Ma, Z., Niisato, N., Miyazaki, H., Kashio, M., Sun, H., Foskett, J.K., & Marunaka, Y. CALHM イオンチャネルの構造・機能の解析. 膜シンポジウム 2014. 2014 年 11 月 26-27 日; 神戸 (兵庫), 口頭. 4. 樽野陽幸 . 味覚神経伝達を担う新規 ATP 放出イオンチャネル CALHM1 の同定. 生理学研究所研究会「粘膜免疫学と膜輸送生理学の融合」2014 年 10 月 27-28 日; 岡崎 (愛知), 口頭. 5. Taruno, A. , Foskett, J.K., & Marunaka, Y. Calcium Homeostasis Modulator (CALHM) ion channel family encoding voltage-gated ATP release ion channels involved in non-synaptic purinergic neurotransmission. 第 37 回日本神経科学大会. 2014 年 9 月 11-13 日; 横浜 (神奈川), 口頭 (招待講演).

	<p>6. 樽野陽幸. 舌における味覚神経伝達の分子機構：CALHM1 による甘味・苦味・うま味の神経伝達. 食と健康プロジェクトセミナー 2014 年 8 月 8 日；東京, 口頭（招待講演）.</p> <p>(C) 国内における一般講演（ポスター）</p> <p>7. Taruno, A. Kashio, M., Sun, H., & Marunaka, Y. Regulation of CALHM1 ion channel by N-linked glycosylation. 第 92 回日本生理学会大会. 2015 年 3 月 21-23 日；神戸（兵庫）, ポスター.</p> <p>8. Taruno, A., Marunaka, Y., & Foskett, J.K. Identification of a novel ATP release ion channel, CALHM1, essentially required for purinergic neurotransmission of tastes. 上皮バリアと輸送についてのシンポジウム. 2014 年 11 月 1-2 日；草津（滋賀）, ポスター.</p>
--	--

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

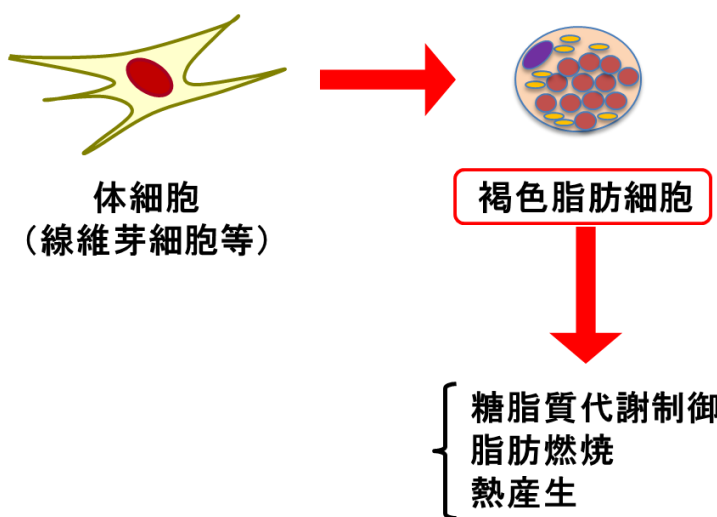
注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	免疫学	研究補助員	江島晃佳
研究の名称	機能的なヒト褐色脂肪細胞を誘導する小分子化合物の探索		
研究のキーワード (注1)	褐色脂肪細胞、小分子化合物、ダイレクト・リプログラミング		
研究の概要 (注2)	 <p>体細胞 (線維芽細胞等)</p> <p>褐色脂肪細胞</p> <p>糖脂質代謝制御 脂肪燃焼 熱産生</p> <p>褐色脂肪細胞は、マウス等においては食物由来の余剰エネルギーを熱として散逸させる細胞として知られるが、ヒトでは新生児にのみ存在し成長に伴って消失すると長らく考えられてきた。成人に存在することは 2007 年に初めて示され、ヒトの褐色脂肪細胞には未解明な点が多い。</p> <p>我々は、ヒト体細胞に遺伝子を導入して褐色脂肪細胞に誘導する技術を確立したので (図)、この成果を基に、ヒト体細胞から褐色脂肪細胞に誘導する小分子化合物を探索することを目的として本研究を行った。</p>		

研究の背景	<p>iPS 細胞研究が、少数の既知因子を遺伝子導入することで、体細胞の運命転換が可能であることを示して以来、リプログラミング技術を用いて様々な細胞種を創出することが可能になった。我々は、ヒト体細胞に少数の遺伝子を導入することにより、多房性の脂肪滴とミトコンドリアが豊富な褐色脂肪細胞を直接誘導することに成功した。この誘導は短期間の培養で行うことができ、たいへん効率が高かった。さらに得られた褐色脂肪細胞は、褐色脂肪細胞特異的な遺伝子群を高発現し、代謝活性を有していた。</p> <p>そこで本研究では、上記の研究成果を基盤として、小分子化合物を用いて、ヒト褐色脂肪細胞を誘導する技術の確立を目指した。</p>
研究手法	<p>ヒト体細胞に上記遺伝子の一部を導入後、化合物ライブラリーを添加して培養し、褐色脂肪細胞様のフェノタイプの誘導を指標にスクリーニングした。ヒットした複数の化合物について、2次スクリーニングを行った。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>体細胞に褐色脂肪細胞様のフェノタイプを誘導する化合物を、複数見出した。これらについて、現在さらなるスクリーニングを進めている。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>成人における褐色脂肪細胞は、肥満と糖尿病の患者では非常に少ないことから、これら代謝疾患との密接な関与が考えられる。小分子化合物による体細胞から褐色脂肪細胞への誘導技術が確立すれば、ヒト褐色脂肪細胞のバイオロジーと代謝疾患における役割に重要な新知見を加えることに繋がり、さらに糖尿病とメタボリック症候群に対する新しい治療技術の開発につながると期待でき、地域にも大きく還元するものと期待できる。</p>
今後の期待	<p>本研究の成果は、糖尿病とメタボリック症候群に対する、全く新しい作用機序に基づく創薬や再生医療への応用が可能と期待できる。</p>

研究発表 (注3)	無
--------------	---

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

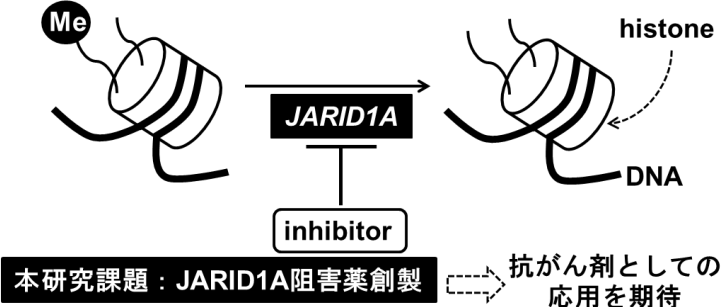
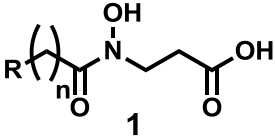
注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	（所 属）	（職 名・学 年）	（氏 名）
研究者	京都府立医科大学	学内講師	伊藤 幸裕
研究の 名称	抗がん活性を有するリシン脱メチル化酵素阻害薬の開発		
研究のキ ーワード （注1）	ヒストン脱メチル化酵素 リシン残基 エピジェネティクス 酵素阻害薬 創薬化学		
研究の 概要 （注2）	<p>Jumonji Cドメインを含むヒストンリシン脱メチル化酵素（JHDM）は遺伝子発現制御機構において重要な役割を担っている。JHDMアイソザイムの一つであるJARID1Aは、がん細胞の転移や浸潤、増殖、薬剤耐性化などに関与することが報告されており、JARID1A阻害薬は新規抗がん剤として期待されている。一方、申請者は、リシン残基の修飾酵素を制御する種々の化合物を見出している。そこで、申請者は、これまでの経験を生かし、抗がん剤としての応用を志向したJARID1A阻害薬の創製研究を行った。</p>		
研究の 背景	<p>ヒストンリシン残基のメチル化は、エピジェネティクス機構（DNAの塩基配列に依らない遺伝子発現機構）において重要な役割を担っており、生命現象に多大な影響を与える。特に、種々のがん細胞においてはヒストンの異常なメチル化状態が見られ、ヒストンのメチル化とがん化は密接な関係にあると考えられている。</p> <p>Jumonji Cドメインを含むヒストンリシン脱メチル化酵素（JHDM）は、ヒストンのメチル化リシン残基の脱メチル化反応を触媒する酵素であり、21種のアイソザイムが知られている。JHDMアイソザイムの一つであるJARID1Aは、がん細胞の転移や浸潤、増殖、薬剤耐性化に関与しており、その阻害薬は抗がん剤としての可能性を秘めている。しかし、JARID1Aを強力に阻害し、細胞系でも活性を示す効果的な阻害薬はなく、その開発が求められている¹。そこで、申請者は強力な活性を持つJARID1A阻害薬創製を目的とし、研究を行った（Fig. 1）。</p>		

	<div style="text-align: center;"> <p>JARID1A</p> <ul style="list-style-type: none"> • ヒストン脱メチル化酵素 • エピジェネティックな遺伝子発現を制御する生体分子 • がん細胞の転移や浸潤、増殖、薬剤耐性化に関与  <p>本研究課題: JARID1A阻害薬創製 → 抗がん剤としての応用を期待</p> </div> <p>Fig. 1 本研究の概要</p>
<p>研究手法</p>	<p>これまでに申請者は JHDM アイソザイムの一つである GASC1 や PHF8 に対する阻害薬をはじめ種々のリシン修飾酵素制御薬の創製に成功している。そこで、これまでの経験を生かし、申請者のグループが保有する GASC1 および PHF8 阻害薬ライブラリーを <i>in vitro</i> の酵素阻害活性評価にてスクリーニングすることで JARID1A 阻害薬のリード化合物が見出せると考え、スクリーニングを行った。その結果、中程度の活性を示す JARID1A 阻害薬を見出した ($IC_{50} = 3.1 \mu M$)。したがって、本研究では、1 の構造展開を行い、高活性かつ細胞系でも効果を示す JARID1A 阻害薬の創出を目指した。具体的に方法は以下に示す。</p> <div style="text-align: center;">  <p>1</p> </div> <p>1. リード化合物のドッキングスタディー 化合物 1 と JARID1A のホモロジーモデル (X 線結晶構造は未報告) を用いてドッキングスタディーを行い、structure-based drug design へと展開した。計算ソフトには Molegro virtual docker を用いた。また、ホモロジーモデルの構築に関しては JARID1A と同じファミリーに属する JMJD2A (PDB ID: 2OQ6) の結晶構造を基に行った。</p> <p>2. 細胞系での活性評価 細胞系での活性評価にはヒストンメチル化体を認識する抗体を用いたウエスタンブロット法 (ヒストンのメチル化量を検出) および MTT アッセイ (がん細胞増殖阻害活性を評価) を用いた。なお、細胞系で高活性化を目指すため、プロドラック体への変換も行った。</p>

研究の進捗状況と成果	<p>上述に記したように申請者のグループが保有するJHDM阻害薬ライブラリーのスクリーニングより見出されたJARID1A阻害薬に関して、ドッキングスタディーによるstructure-based drug designを展開した結果、元の化合物よりも、効果的にJARID1Aを阻害する化合物を見出した。さらに、その化合物の膜透過性プロドラッグ体は細胞評価系でJARID1Aを阻害することが示唆された。さらに、見出した阻害薬はヒストン脱アセチル化酵素と併用することで効果的に抗がん活性を示すことが明らかとなった。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>現在のところ、直接的に研究成果を還元できていない。近畿地区で行われた日本薬学会近畿支部大会で、研究成果を発信したのみである。今後、さらに研究を進め、新規抗がん剤治療薬の開発を目指すことで地域へ還元していきたいと考えている。</p>
今後の期待	<p>本研究課題の成功は、分子生物学・医学に多大な影響を与えることが期待される。現在、ヒストンのメチル化に関する研究は盛んに行われているが、JARID1Aを効果的に阻害する薬物の報告例はなく、その創出が求められていた。本研究により見出された阻害薬はがん化とJARID1Aとの関係を明らかとするケミカルツールとしてだけでなく、新規抗がん剤としての応用の可能性を秘めている。今後、JARID1A阻害薬が動物実験・臨床試験を経て、新薬に繋がることが期待される。</p>
研究発表 (注3)	<p><学会発表></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 伊藤幸裕、澤田英之、照屋健太、水上民夫、鈴木孝禎 JARID1A 選択的阻害薬の創製 第64回日本薬学会近畿支部大会 H-10-2 2014年10月 京都 2. 伊藤幸裕、澤田英之、鈴木美紀、水上民夫、鈴木孝禎 JARID1A 阻害薬の創製とがん細胞に対する効果 日本薬学会 第135年会 28T-am07 2015年3月 神戸

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

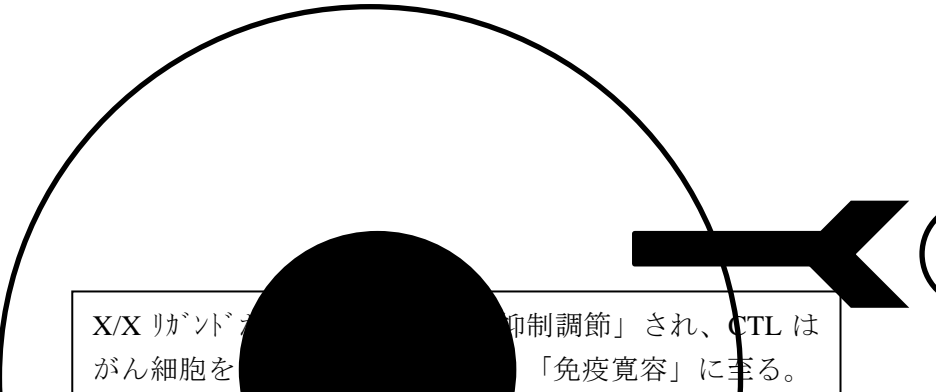
注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	小児発達医学	助教	吉田 秀樹
研究の 名称	免疫学的手法を用いた新規小児がん治療戦略の展望		
研究のキ ーワード (注1)	横紋筋肉腫、腫瘍免疫、免疫逃避		
研究の 概要 (注2)	<p>我々は、がん細胞が免疫監視機構に対応して逃避するメカニズムを獲得していることに着目した。本研究では、予後不良な融合遺伝子陽性横紋筋肉腫において、<i>PAX3-FOXO1A</i>融合遺伝子が免疫逃避に果たす役割を検討した。</p> <div style="border: 1px solid black; height: 200px; width: 100%; margin-top: 10px;"></div>		

	<p>*CTL, cytotoxic T lymphocyte; MHC, Major histocompatibility; TCR, T cell receptor</p> <p>図1. 遺伝子 X を介した、がんの免疫寛容の機序</p>  <p>X/X リガンドが「抑制調節」され、CTL は「免疫寛容」に至る。</p>
<p>研究の背景</p>	<p>腫瘍細胞は免疫抑制的に働き、陽性横紋筋肉腫に未解明の部分</p>
<p>研究手法</p>	<p>① 小腸癌細胞株においてリアルタイム PCR 法で検出された。</p> <p>② IFN-γ を添加した横紋筋肉腫細胞株における遺伝子 X の発現変化を検討した。</p> <p>③ IFN-γ による遺伝子 X 発現誘導が、<i>PAX3-FOXO1A</i> ノックダウンにより、どのように変化するかをリアルタイム PCR 法、フローサイトメトリー法により、それぞれ mRNA レベル、蛋白レベルで検討した。</p>
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>横紋筋肉腫細胞株は遺伝子 X の発現が高い傾向を示した。また <i>PAX3-FOXO1A</i> 陽性横紋筋肉腫細胞株 Rh30 では、IFN-γ 添加により遺伝子 X 発現の増加を認めた。続いて <i>PAX3-FOXO1A</i> ノックダウン後、IFN-γ 添加を行ったところ、IFN-γ による遺伝子 X 発現誘導は mRNA レベル、蛋白レベルで低下した。予後不良な <i>PAX3-FOXO1A</i> 陽性横紋筋肉腫において、<i>PAX3-FOXO1A</i> は遺伝子 X を介して、腫瘍免疫逃避を促進させることを示唆する所見と考えられた。</p>

地域への研究成果の還元状況	本研究の成果により、遺伝子Xを介した横紋筋肉腫の免疫逃避機構の一部が明らかになった。遺伝子Xを抑制する薬剤は開発されており、遺伝子Xを高発現している癌腫、肉腫、芽腫において、予後の改善をもたらす新規治療法となり得る。こうした細胞療法および免疫療法の追究は近い将来、患児の急性毒性、長期合併症を軽減した治療につながる可能性を秘めていると考える。
今後の期待	本研究の成果は、成人癌への応用が可能であり、今後の大学のがん治療研究推進の一助になると考える。
研究発表 (注3)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Yoshida H, Miyachi M, Sakamoto K, Ouchi K, Yagyu S, Kikuchi K, Kuwahara Y, Tsuchiya K, Imamura T, Iehara T, Kakazu N, Hojo H, Hosoi H. Deciphering the mechanism of PAX3-NCOA2 tumorigenesis in rhabdomyosarcoma. 2014 CTOS Annual Meeting. Oct 15-18, Berlin, Germany 2. 吉田秀樹、宮地 充、大内一孝、栗原康道、土屋邦彦、家原知子、小西英一、柳澤 昭夫、細井 創. 脂肪芽腫における新規融合遺伝子COL3A1-PLAG1およびRAB2A-PLAG1の同定. 第73回日本癌学会学術集会. 2014年9月25日－9月27日；横浜.

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	血液・腫瘍内科学教室	大学院生・4年	知念 良顕
研究の 名称	骨髄異形成症候群におけるキメラ遺伝子の同定		
研究のキ ーワード (注1)	染色体転座、骨髄異形成症候群、5q-症候群、キメラ遺伝子		
研究の 概要 (注2)	<p>多くのがん細胞には染色体転座によってキメラ遺伝子が形成されており、細胞をがん化させる要因だと考えられている。新たながん関連遺伝子ならびにキメラ遺伝子による腫瘍化のメカニズムを解明する目的で以下のような研究を行う。</p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-right: 10px;"> <p>ヒト染色体</p> </div> <div> <p>我々の教室ではMDSにおける染色体異常の病因的関与について長年取り組んでおり、独自に確立したゲノムアレイ解析とバブルPCR法を組み合わせることで、特定の領域を集中的に解析し、造血器悪性腫瘍における新規キメラ遺伝子を多数同定している。今回の研究では、5番染色体長腕の腕内欠失を示すMDS症例（5q-症候群症例）において、染色体欠失領域の断端にキメラ遺伝子が形成されているかを検証する。遺伝子異常が認められれば、その遺伝子異常を元に、機能解析を行い、分子標的治療薬の開発を目指す。</p> </div> </div>		
研究の 背景	<p>骨髄異形成症候群（MDS）は、遺伝子異常を持った造血幹細胞がクローン性に増殖し、正常造血幹細胞の発育・成熟を阻害することで正常な造血機能を障害する一方、さらなる遺伝子異常の蓄積により急性骨髄性白血病へと進展する造血器悪性腫瘍の一つである。近年、MDSの病態解明のために網羅的な遺伝子解析が進められ、多数の遺伝子異常が同定されてきたが、上述の遺伝子異常のみでは病態を十分に説明できていないのが現状である。また、MDSを特徴づけるキメラ遺伝子は未だ同定されていない</p>		

	<p>。難治性疾患であるMDSの病態解明および治療薬開発を進めるためには、疾患特異的な分子異常を明らかにすることが必要であり、現在判明している遺伝子異常のみでは不十分である。このため、これまでとは異なったアプローチによる新規の遺伝子異常を発見することが喫緊の課題である。</p>
研究手法	<p>SNP-Arrayを用いたMDS検体の染色体解析 バブルPCR法を用いたキメラ遺伝子の検出 FISH法による染色体転座の検出</p>
研究の進捗状況と成果	<p>MDS (5q-症候群)患者検体 1 例を対象に、5 番染色体長腕の欠失領域について SNP-Array を用いて解析を行った。結果、5q21.1 から 5q34 までゲノムの欠失が見られた。さらに詳細に解析を進めた結果、5q21.1 側の切断点には遺伝子が含まれていなかったが、5q34 側の切断点には BC011998 と呼ばれる遺伝子が含まれていることがわかった。BC011998 は機能が十分に明らかにされていない遺伝子であった。切断点にキメラ遺伝子が形成されている可能性を考え、バブル PCR 法を用いて cDNA 断片をクローニングしたところ、リボソームタンパク遺伝子である RPS15 が BC011998 とキメラを形成していることがわかった。驚くべき事に、BC011998 自身も RPS15 と配列が酷似していることが判明し、BC011998 は RPS15 の pseudogene である可能性が考えられた。RPS15 に特異的な DNA プローブを用いて、FISH 解析を行ったところ、RPS15 が座位する 19 番染色体短腕と BC011998 が座位する 5 番染色体長腕との染色体転座は確認できなかった。しかしながら、RPS15 と BC011998 の各々に特異的なプライマーを設計し、RT-PCR を行ったところ、正常検体では RPS15-BC011998 のキメラ産物は検出されず、本症例でのみ検出された。このことから、RPS15-BC011998 キメラ遺伝子は MDS において、染色体転座以外のなんらかのメカニズムの働きで形成された可能性が示唆された。現在、方法の改善を行い、このキメラ遺伝子の意義について研究を継続中である。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>現在、研究成果を当科のホームページに掲載できるよう準備中である。</p>

今後の期待	MDSに対するゲノム解析は、全ゲノムシーケンス法を用いることで近年急速に解明されてきている。しかしながら、遺伝子解析のみでは病態を十分に解明できないことが示唆されつつある。non-coding RNAを含めた幅広い解析を行うことで、MDSの病態解明により深く迫ることができると考えられる。今回の発見は、遺伝子ではない領域において、正常ではない変化が起きていたことが観察された。この結果がMDSの病態解明の糸口になるよう、さらに研究を継続中である。
研究発表 (注3)	最終的にデータがそろった段階で、これらの研究成果は国内外の学会での発表を行うほか最終的には英文医学雑誌への投稿を行う予定である。

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	小児発達医学	大学院3年生	山下 哲史
研究の 名称	iPS細胞を用いた脳形成異常の病態解析		
研究のキ ーワード (注1)	脳形成異常、iPS細胞、STXBP1遺伝子、大田原症候群		
研究の 概要 (注2)	<p>STXBP1 (syntaxin binding protein 1) は中枢神経組織で特に強く発現し、細胞内でsyntaxinと結合することで、シナプス小胞の開口放出など様々な細胞内小胞輸送に関与している。STXBP1遺伝子変異は、ハプロ不全により、大田原症候群 (OS) をはじめとする乳児期発症難治性てんかんを引き起こすが、それに加え脳MRIで脳梁低形成や前頭葉萎縮、脳切除標本で皮質形成異常を認める症例があることより、神経発生異常が病態の基盤となっている可能性が指摘されている。しかし実際の患者より脳組織を得ることは積極的外科治療の適応とならない限り困難であり、またモデルマウスでも、神経発生異常は認めない。そのため、STXBP1のハプロ不全による神経発生異常を解析するためのよりよいモデルが必要である。</p> <p>近年開発されたヒト疾患特異的iPS細胞技術により、患者からiPS細胞を樹立し、その後神経細胞に分化させることで、遺伝子異常が引き起こす神経発生過程の障害を解析することが可能となった。本研究ではSTXBP1遺伝子にヘテロでナンセンス変異を有するOS患者から樹立したiPS細胞を用いて、STXBP1遺伝子変異による脳形成異常の病態を解明する。</p>		
研究の 背景	<p>遺伝子解析手法の進歩により脳形成異常の原因遺伝子が加速度的に同定され、その診断分類は複雑性を増している。正確な診断分類を構築することは、診療において併発症と予後の予測や遺伝相談に必須であり、そのためには個々の遺伝子異常が脳形成異常を引き起こす機序を明らかにすることが重要である。</p> <p>今回はSTXBP1遺伝子変異による脳形成異常に着目し解析を行う。</p>		

研究手法	STXBP1遺伝子による大田原症候群患者よりiPS細胞を樹立する。SFEBq法により神経細胞へ分化させ、生化学的手法や画像解析法を用いて、細胞機能障害を評価する。
研究の進捗状況と成果	<p>1. ヒトSTXBP1ハプロ不全神経モデルの確立 SFEBq神経誘導法を用いて、iPS細胞よりニューロスフェアを作成した。神経誘導開始20日目のニューロスフェアで、STXBP1のmRNAおよびタンパク質量が、コントロールクローンに対して、疾患クローンで半量になっていることを確認した。</p> <p>2. 神経突起伸展の解析 神経誘導開始20日目のニューロスフェアを、接着培養し、24時間での神経突起の伸展を、コントロールと疾患クローンで比較した。疾患クローンでは神経突起の伸展が、コントロールクローンに比して、有意に減少していた。</p>
地域への研究成果の還元状況	現時点で本研究の成果を地域へ還元した実績はないが、本研究で得た結果を踏まえてさらに詳細な病態解析を継続している。今後の成果によっては地域への還元を進めていく予定である。
今後の期待	今まで患者神経細胞を用いた解析を行う事は不可能であったが、ヒト疾患特異的iPS細胞技術を用いることにより、特異的遺伝子が引き起こす脳形成障害の機序の一部を明らかにすることができた。本研究は、脳形成異常の病態解析のモデルケースとして今後の研究に貢献できると考えられる。
研究発表 (注3)	本研究に関する発表は現時点ではない。

- 注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。
- 注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。
- 注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。
- 注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。
- 注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	小児発達医学	大学院3年生	山下 哲史
研究の 名称	iPS細胞を用いた脳形成異常の病態解析		
研究のキ ーワード (注1)	脳形成異常、iPS細胞、STXBP1遺伝子、大田原症候群		
研究の 概要 (注2)	<p>STXBP1 (syntaxin binding protein 1) は中枢神経組織で特に強く発現し、細胞内でsyntaxinと結合することで、シナプス小胞の開口放出など様々な細胞内小胞輸送に関与している。STXBP1遺伝子変異は、ハプロ不全により、大田原症候群 (OS) をはじめとする乳児期発症難治性てんかんを引き起こすが、それに加え脳MRIで脳梁低形成や前頭葉萎縮、脳切除標本で皮質形成異常を認める症例があることより、神経発生異常が病態の基盤となっている可能性が指摘されている。しかし実際の患者より脳組織を得ることは積極的外科治療の適応とならない限り困難であり、またモデルマウスでも、神経発生異常は認めない。そのため、STXBP1のハプロ不全による神経発生異常を解析するためのよりよいモデルが必要である。</p> <p>近年開発されたヒト疾患特異的iPS細胞技術により、患者からiPS細胞を樹立し、その後神経細胞に分化させることで、遺伝子異常が引き起こす神経発生過程の障害を解析することが可能となった。本研究ではSTXBP1遺伝子にヘテロでナンセンス変異を有するOS患者から樹立したiPS細胞を用いて、STXBP1遺伝子変異による脳形成異常の病態を解明する。</p>		
研究の 背景	<p>遺伝子解析手法の進歩により脳形成異常の原因遺伝子が加速度的に同定され、その診断分類は複雑性を増している。正確な診断分類を構築することは、診療において併発症と予後の予測や遺伝相談に必須であり、そのためには個々の遺伝子異常が脳形成異常を引き起こす機序を明らかにすることが重要である。</p> <p>今回はSTXBP1遺伝子変異による脳形成異常に着目し解析を行う。</p>		

研究手法	STXBP1遺伝子による大田原症候群患者よりiPS細胞を樹立する。SFEBq法により神経細胞へ分化させ、生化学的手法や画像解析法を用いて、細胞機能障害を評価する。
研究の進捗状況と成果	<p>1. ヒトSTXBP1ハプロ不全神経モデルの確立 SFEBq神経誘導法を用いて、iPS細胞よりニューロスフェアを作成した。神経誘導開始20日目のニューロスフェアで、STXBP1のmRNAおよびタンパク質量が、コントロールクローンに対して、疾患クローンで半量になっていることを確認した。</p> <p>2. 神経突起伸展の解析 神経誘導開始20日目のニューロスフェアを、接着培養し、24時間での神経突起の伸展を、コントロールと疾患クローンで比較した。疾患クローンでは神経突起の伸展が、コントロールクローンに比して、有意に減少していた。</p>
地域への研究成果の還元状況	現時点で本研究の成果を地域へ還元した実績はないが、本研究で得た結果を踏まえてさらに詳細な病態解析を継続している。今後の成果によっては地域への還元を進めていく予定である。
今後の期待	今まで患者神経細胞を用いた解析を行う事は不可能であったが、ヒト疾患特異的iPS細胞技術を用いることにより、特異的遺伝子が引き起こす脳形成障害の機序の一部を明らかにすることができた。本研究は、脳形成異常の病態解析のモデルケースとして今後の研究に貢献できると考えられる。
研究発表 (注3)	本研究に関する発表は現時点ではない。

- 注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。
- 注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。
- 注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。
- 注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。
- 注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	（所 属）	（職 名・学 年）	（氏 名）
研究者	京都府立医科大学 分子病態病理学	大学院生	荻 寛志
研究の 名称	小頭症関連遺伝子 <i>Aspm</i> の脳形成・発達に関わる機能解明		
研究のキ ーワード （注 1）	小頭症、 <i>Aspm</i> 、脳形成・発達、 <i>in vivo</i> イメージング、行動実験		
研究の 概要 （注 2）	<p>本研究はヒトの先天性小頭症（MCPH-5）の原因遺伝子である <i>Aspm</i> 遺伝子の脳形成・発達期に関わる機能解明を目的としたものである。並行して進められている、（独）放射線医学総合研究所との共同研究（遺伝子やタンパクなど分子レベルの解析）を補完する形で、個体レベルの表現型（<i>in vivo</i> イメージング、行動）を指標とした脳における <i>Aspm</i> の機能解明を企図した。</p> <p><i>Aspm</i> 遺伝子欠損動物（モデル動物）の <i>in vivo</i> イメージングを（独）放射線医学総合研究所で行い、撮影データの解析や行動実験等を京都府立医科大学で実施する形で進めた。</p>		
研究の 背景	<p><i>Aspm</i> 遺伝子はヒトの先天性小頭症（MCPH-5）の原因遺伝子でありこれまでの研究により放射線曝露で誘発される小頭症との関連性などが明らかになっている。一方、脳の形成・発達期において、<i>Aspm</i> は神経幹細胞の対称性分裂、有糸分裂の紡錘体形成等との関与が示唆されているものの、その詳細な機能については明らかになっていない。</p> <p><i>Aspm</i> の脳形成・発達期の機能解明を進めることで、複雑な脳形成・発達プロセスの一端を明らかにし、ひいては先天性小頭症の予防や治療に還元することが望まれる。</p>		

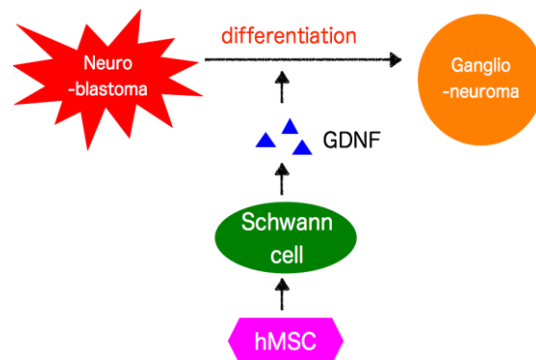
研究手法	<p>(独) 放射線医学総合研究所にてモデル動物の作製と <i>in vivo</i> イメージングを行い、撮影データの解析や行動実験等を京都府立医科大学で実施する。<i>In vivo</i> イメージングは、時系列的に複数回撮影を行う。必要に応じて、イメージング解析結果を裏付ける形態学的あるいは生化学的な検証を行う。</p> <p>行動実験は、小頭症症状を呈する疾患や遺伝子変異において確認されている行動表現型を参考に実施する。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>モデル動物の <i>in vivo</i> イメージングにおいて、若齢では固定法などで困難を伴ったが、条件検討を重ね解析に耐えうる手法・条件を確立することができた。現在この手法・条件の元に撮影を進めているところである。</p> <p>行動実験については、<i>in vivo</i> イメージングと独立して予備的な検討を行い、より正確に評価するための改良を実施中である。</p>
地域への研究成果の還元状況	現時点では無し。
今後の期待	<p><i>In vivo</i> イメージングの撮影が現在進行中であるが、実験終了次第、結果をまとめ学術論文等での発表を考えている。</p> <p>本研究で使用している手法は他の脳形成異常を呈する疾患や関連する遺伝子の原因・機能解明にも適用可能であり、研究加速への貢献が期待される。</p>
研究発表 (注3)	現時点では無し。

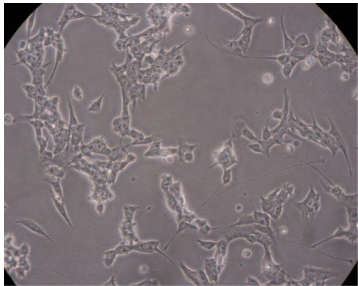
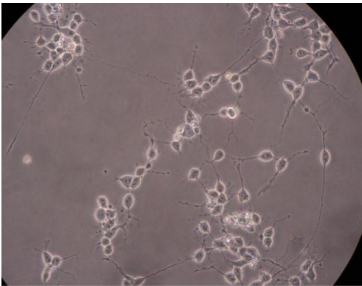
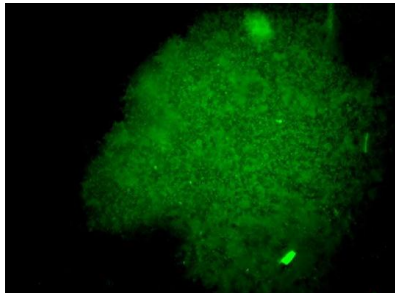
- 注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。
- 注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。
- 注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。
- 注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。
- 注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。

別紙様式 3

若手研究者育成支援費に係る研究成果報告（ホームページ用）

	(所 属)	(職 名・学 年)	(氏 名)
研究者	小児外科	大学院生・3	木村 幸積
研究の 名称	脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による神経芽腫に対する 新規分化誘導療法の開発		
研究のキ ーワード (注1)	神経芽腫, 間葉幹細胞, 分化誘導療法, Schwann 細胞, GDNF		
研究の 概要 (注2)	<p>神経芽腫は多様な腫瘍特性を有しているが、その中でも特筆すべきものとして神経節腫への maturation がある。これは神経芽腫細胞が正常な交感神経節細胞へと分化成熟し、<u>良性の神経節腫へと分化して治癒に至る神経芽腫特有の現象</u>である。病理学的に神経芽腫と神経節腫との大きな違いは、後者には間質に Schwann 細胞(SC)が豊富に含まれていることである。また、SCから放出される神経栄養因子である GDNF が神経芽腫細胞の分化を促進することが知られている。実際、坐骨神経損傷マウスの坐骨神経に神経芽腫細胞を注入すると、SC が活性化し、GDNF の分泌亢進がおり、神経芽腫細胞の分化が促進されることが報告されている (Liu S et al, Am J Pathol, 2005)。さらに、神経再生の研究分野では、<u>ヒト脂肪由来の間葉系幹細胞 (hMSC)</u> をマウスの尾静脈より投与すると SC が活性化され GDNF の放出が増加することにより神経の再生が促進されることが報告されている (Marconi S et al, Tissue Eng Part A, 2012)。</p> <p>以上のことから、神経芽腫の新規治療として、<u>ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (hMSC) 投与により、SCを刺激しGDNFの分泌を促進することにより、<u>神経芽腫を神経節腫へと maturationさせる新規分化誘導療法</u></u>を</p>		



	考案した。
研究の背景	<p>神経芽腫は、小児固形悪性腫瘍のなかで脳腫瘍に次いで頻度の高い疾患である。近年の集学的治療（化学療法、外科療法、放射線療法）の進歩、グループスタディによる症例の蓄積によりその治療成績は飛躍的に向上しているが、MYCN 遺伝子増幅例に代表されるような高リスク群においては、<u>3年生存率は約40%と未だ予後不良</u>である。このため、更なる治療成績の向上のためには、新規治療法の開発が喫緊の課題である。</p>
研究手法	<p>in vitro の実験では、ヒト神経芽腫細胞株 (SK-N-SH) を hMSC 培養上清で培養し、分化誘導効果の有無を判定した。</p> <p>一方、in vitro の実験では、対象動物として MYCN トランスジェニックマウス (MYCN-TgM) を用いて、hMSC を腫瘍へ直接投与または腹腔内へ投与することにより投与経路の適性および生存率の変化を判定した。</p>
研究の進捗状況と成果	<p>in vitro ではヒト神経芽腫細胞株 (SK-N-SH) を hMSC の培養上清を用いて培養することにより、神経突起の伸長がみられ（右下図）、hMSC からの液性因子が分化誘導効果をもたらすことが確認された。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p style="text-align: center;">(維持培養液のみで培養) (hMSC 培養上清で培養)</p> <p>in vivo の実験では当初開腹手術により腫瘍に直接 hMSC 投与を行ったが、生存率に改善は見られず、腹腔内投与においても同様の結果であったものの、腫瘍への hMSC の集積が確認された。</p> <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">  </div> <p style="text-align: center;">(GFP でラベリングした hMSC が腫瘍内で集積している)</p>

地域への研究成果の還元状況	特になし
今後の期待	hMSC の液性因子が分化誘導効果をもつこと、さらに hMSC の投与経路が腹腔内投与であってもマウスの免疫反応により拒絶されることなく腫瘍への集積がみられたことは、本研究が神経芽腫に対する新たな治療法となりうることを示唆するものと考えられる。
研究発表(注3)	2015 年第 52 回日本小児外科学会学術集会にて発表を予定している。

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。